

MECHANISMUS DER ANTIMYCIN-RESISTENZ
DER MUTANTE ANT 8 VON SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE,
SOWIE FUNKTION ZWEIER SPEZIFISCHER BINDUNGSSTELLEN
FÜR ANTIMYCIN IM ELEKTRONENTRANSPORT
DER ATMUNGSKETTE DES WILDTYPS
DES GLEICHEN ORGANISMUS

Gertraud Burger

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Genetischen Institut der Universität München

Lehrstuhlleiter : Prof. Dr. F. Kaudewitz

MECHANISMUS DER ANTIMYCIN - RESISTENZ DER MUTANTE
A N T 8 VON SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE,
SOWIE FUNKTION ZWEIER SPEZIFISCHER BINDUNGSSTELLEN
FÜR ANTIMYCIN IM ELEKTRONENTRANSPORT DER ATMUNGS -
KETTE DES WILDTYPS DES GLEICHEN ORGANISMUS.

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs
Biologie der Ludwig-Maximilian-Universität München.

Vorgelegt von Gertraud Burger

München, 1975



1. Gutachter: Prof. Dr. F. Kaudewitz
2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. W. Bandlow

Tag der mündlichen Prüfung: 30.6.1976

Die vorliegende Arbeit wurde von 1972 bis 1975 im Genetischen Institut der Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. Kaudewitz und Doz. Dr. Bandlow durchgeführt.

Wegen der Aktualität des Themas und der Bearbeitung zum Teil überschneidender Fragestellungen in in- und ausländischen Arbeitsgruppen wurden mit Erlaubnis des Dekans der Fakultät für Biologie Teilergebnisse dieser Dissertation bereits veröffentlicht:

Lang, B., Burger, G. und Bandlow, W. (1974)

"Activity of reduced ubiquinone : cytochrome c oxidoreductase with various ubiquinol - isoprenologues as substrate and corresponding inhibitory effect of antimycin in yeast".

Biochim. Biophys. Acta 368, 71 - 85

Burger, G., Lang, B., Bandlow, W. und Kaudewitz, F. (1975)

"Studies on the mechanism of electron transport in the bc₁ - segment of the respiratory chain in yeast. II. The binding of antimycin to mitochondrial particles and the function of two different binding sites.

Biochim. Biophys. Acta 396, 189 - 201

Lang, B., Burger, G., Wolf, K., Bandlow, W. und Kaudewitz, F. (1975)

"Studies on the mechanism of electron transport in the bc₁ - segment of the respiratory chain in yeast. III. Isolation and characterisation of an antimycin resistant mutant A N T 8 in Sch. pombe".

Molec. Gen. Genet. 137, 353 - 363

Burger, G. und Lang, B. (1975) a)

"The inhibitory effect of antimycin in an antimycin resistant mutant of *Sch. pombe*".

Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 224

Lang, B. und Burger, G. (1975) a)

"The binding of antimycin to mitochondrial particles and its effect on cytochrome b reduction in an antimycin resistant mutant of *Sch. pombe*".

Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 248

Herrn Prof. Dr. Kaudewitz und Herrn Doz. Dr. Bandlow bin ich für die Problemstellung, Anleitung und Betreuung dieser Dissertation verpflichtet. Ihnen möchte ich sowohl für die grosszügige Förderung dieser Arbeit, zahlreiche Anregungen und Kritik, als auch für die Bereitstellung eines modern ausgerüsteten Laborplatzes und für versuchstechnische Anleitung danken.

Mit Herrn Dr. Wolf hat sich eine äusserst fruchtbare Zusammenarbeit entwickelt. Durch seine genetische Analyse wurde die Bedeutung der Antimycin - Resistenz klar: der erste extrakaryotische Marker von *Schizosaccharomyces* war gefunden.

Die Diskussionen mit Herrn Dr. Berden und Herrn Grimmelikhuijzen (Amsterdam), Herrn Dr. Goffeau (Brüssel), Herrn Dr. von Jagow und Herrn Dr. Kröger (München) und Herrn Dr. Thomas ergaben viele Denkanstösse für die Interpretation der biochemischen Ergebnisse.

Mein Dank gilt auch Herrn Manhart für die Durchführung von Extrareduktions-Experimenten und Frau Krombacher für die Assistenz bei der Aufnahme der Wachstumskinetik.

Der Universität München bin ich für die Gewährung eines Graduierten-Stipendiums und der DFG für die finanzielle Unterstützung bis zum Abschluss meiner Dissertation zu Dank verpflichtet.

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung	6
II. Material und Methoden	11
1. Hefestämme	11
2. Chemikalien	11
3. Hefezüchtung und Wachstum auf Antimycin	11
4. Isolation Antimycin - resistenter Mutanten	12
5. Präparation mitochondrialer Partikel	13
6. Enzymatische Tests	14
7. Tieftemperatur - Spektroskopie	14
8. Extrareduktion des Cytochrom b-566 und Bestimmung des Cytochromgehalts	16
9. Bindung von Antimycin an mitochondriale Partikel	16
10. Proteinbestimmung	16
III. Ergebnisse	17
1. Isolation Antimycin - resistenter Mutanten	17
2. Wachstum auf Antimycin	17
3. Präparation mitochondrialer Partikel	19
4. Hemmung der NADH - Oxidase durch Antimycin	20
5. Hemmung der NADH : Cytochrom c - Oxidoreduktase durch Antimycin	23
6. Bindung von Antimycin an mitochondriale Partikel	26
7. Cytochromgehalt des mitochondrialen Proteins	38
8. Cytochromspektren bei 77°K	39
9. Extrareduktion von Cytochrom b-566.	42

IV. Diskussion	46
A. Die Atmungskette des Wildtyps von Sch. pombe	46
1. Bindung und Hemmwirkung von Antimycin	46
2. Modell der Atmungskette bei Sch. pombe	47
B. Die Antimycin - Resistenz	57
1. Bindung und Hemmwirkung von Antimycin bei ANT 8	57
2. Vergleich von Extrareduktion und Hemmung durch Antimycin bei ANT 8	61
3. Aufhebung der Extrareduktion und der Antimycin - Hemmung durch Ubichinone	61
4. Spektrale Veränderung der b - Cytochrome von ANT 8	64
V. Zusammenfassung	66
VI. Literaturverzeichnis	68
VII. Anhang	74

EINLEITUNG

Das mitochondriale Genom der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* enthält genetische Informationen, deren primäre oder sekundäre Produkte bisher weitgehend unerforscht sind. Wir wissen mehr über die Funktionen der Mitochondrien, welche von solchen Genprodukten der mitochondrialen DNS hervorgerufen werden. So lassen sich die Resistenz gegen Hemmstoffe der mitochondrialen Proteinsynthese (Linnane et al., 1968) und der oxidativen Phosphorylierung (Avner und Griffiths, 1970) Genorten des mitochondrialen Genoms von *S.cerevisiae* zuordnen.

Bei petit - negativen Hefen, wie *Schizosaccharomyces*, sind dagegen extrakaryotisch vererbte Mutationen bislang völlig unbekannt. Auch ist noch nicht geklärt, inwieweit bei diesen Organismen Struktur und Funktion der Mitochondrien durch Kooperation chromosomaler und extrachromosomaler Gene festgelegt werden.

Die in dieser Arbeit untersuchten, von mir isolierten Antimycin - resistenten Mutanten von *Schizosaccharomyces pombe* zeigen in der Weitergabe der Resistenz einen nicht mendelnden Erbgang. Die Antimycin - Resistenz muss deshalb auf einer genetischen Determinante lokalisiert sein, die nicht identisch ist mit einer der bislang drei nachgewiesenen karyotischen Kopplungsgruppen. Da weder über die genetische Codierung der Atmungskettenenzyme, noch über extrachromosomale

Vererbung bei petite - negativen Hefen Daten vorliegen, wird hiermit ein für diese Organismen bisher noch nicht bekannter Mutantentyp vorgestellt. Der Nachweis, ob der genetische Faktor, der die Information zur Antimycin - Resistenz trägt, das mitochondriale Genom ist, kann wegen des bisherigen Mangels der Kenntnis mitochondrialer Marker nicht positiv geführt werden. Auch ein Vergleich mit *Saccharomyces* ist nicht ohne weiteres möglich: Die Differenzen in der Morphologie der Zellen beider Hefen und ihre verschiedenen Teilungsmechanismen könnten zu Abweichungen im Modus der mitochondrialen Vererbung bei *Schizosaccharomyces* und *Saccharomyces* geführt haben. Zieht man in Betracht, dass während der Sporenbildung bei *Schizosaccharomyces* vermutlich wenig oder keine Durchmischung des Plasma beider fusionierter Zellen stattfindet, so lassen die Kreuzungsergebnisse Antimycin - resistenter Mutanten von *Sch. pombe* auf einen mitochondrialen Erbgang schliessen (Wolf et al., 1975 a), in Vorbereitung).

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit war zunächst, bei einer Mutante die Art der komplexen Veränderungen zu untersuchen, welche die Antimycin - Resistenz verursacht. Dies umfasst die Frage nach der enzymatischen Funktion der Atmungskette der Mutante: Bindet Antimycin nur locker an die Mitochondrien und wird deshalb der Elektronentransport erst bei hohen Hemmstoffkonzentrationen blockiert, - oder findet trotz fester Bindung keine adäquate Beeinflussung der Atmungsketten - Aktivität statt, weil die Bindungsstelle die Kontrollfunktion für den

Elektronentransport verloren hat? Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Blockade umgangen wird, indem die Elektronen über einen anderen Weg als im Wildtyp zum Sauerstoff gelangen. Desweiteren sollte beantwortet werden, welche Ausstattung an Cytochromen die Mutante besitzt und welches Redoxverhalten sie in Gegenwart und Abwesenheit von Antimycin zeigen. Daraus könnten Hinweise auf den Ort der Anlagerungsstelle des Antibiotikum erhalten werden.

Ein zusätzliches Problem bedeutet das Auftreten von unterschiedlichen Resistenzgraden nach Segregation diploider, für die Antimycin - Resistenz gemischterbiger Zellen. Dasselbe ist der Fall für die spontan entstandenen, stabilen atmungsdefekter Kolonien der hier beschriebenen Mutante A N T 8 (Wolf et al., 1975 b), in Vorbereitung). Nur eine genaue Kenntnis der Atmungsketten - Funktion des Wildtyps erlaubt es, die vielfältigen phänotypischen Veränderungen, die als Folge der Mutation auftraten, zu beschreiben und zu erklären.

Daraus ergab sich als erweiterte Fragestellung diejenige nach dem Mechanismus des Elektronentransports der Atmungskette, insbesondere im bc_1 - Segment, und der Antimycin - Hemmung im Wildtyp.

Die Funktion der Atmungskette im bc_1 - Segment ist an Rinderherzmitochondrien am besten untersucht. Spektroskopische und enzymkinetische Experimente sowie Antimycin - Bindungsstudien wurden zunächst als Hinweis für einen linearen, unverzweigten Elektronentransport - Weg gedeutet (Berden und

Släter, 1970, 1972). Unvereinbar damit ist jedoch die Tatsache, dass an mitochondriale Partikel gebundenes Antimycin mit Äther nur zu 50 % extrahiert werden kann (Bryka et al., 1969). Dies spricht dafür, dass Antimycin an mindestens zwei unterschiedlichen Stellen der Atmungskette gebunden wird. Das Redoxverhalten der b - Cytochrome in Anwesenheit von Antimycin ist weder mit einem linearen Elektronentransport, noch durch zwei oder mehr Antimycin - Bindungsstellen zu erklären. Deshalb wurde ein Modell der Atmungskette vorgeschlagen, in dem die Elektronen auf gegabeltem Weg zur Endoxidase fließen, wobei nur einer der beiden Äste durch Antimycin zu blockieren ist und die Cytochrome b und c_1 enthält (Wikström und Berden, 1972).

Von Hefe ist bekannt, dass die Hemmkurven des Elektronentransports der Atmungskette mit Antimycin, -wie beim Rinderherz-, sigmoidale Form aufweist (Butow und Zeydel, 1968). Auch soll Antimycin in beiden Organismen mit ähnlicher Stärke und Stöchiometrie an die mitochondrialen Partikel binden. Die Verschiebung des Absorptionsmaximum von Cytochrom b-566 durch Antimycin und die Verdopplung der Höhe dieses Maximum, die zum erstenmal von Chance (1958) an Rinderherzmitochondrien beobachtet wurden, konnten ebenfalls bei Hefe nachgewiesen werden (Grimmelikhuijzen et al., 1975). In der Literatur wurde bereits von zwei Antimycin - resistenten Mutanten der vegetativen Hefe *Candida utilis* berichtet: Zuerst in Hinblick auf die Phosphorylierungsstelle II (Butow und Zeydel, 1968),

später bezüglich der b - Cytochrome, sowie der Bindung und Hemmwirkung des Antibiotikum (Grimmelikhuijzen und Slater, 1973; Grimmelikhuijzen et al., 1975). Doch lassen die differierenden Formen der Hemmkurven mit Antimycin schliessen, dass die hier beschriebene Mutante von Sch. pombe, A N T 8, einem anderen Resistenztypus angehört als die beiden Candida - Mutanten.

Da genauere Vorstellungen über den Elektronentransport und die Antimycin - Hemmung beim Hefewildtyp bislang nicht entwickelt wurden, begann die experimentelle Arbeit mit der eingehenden Untersuchung des Elektronentransports und der Antimycin - Hemmung verschiedener Teilabschnitte der Atmungskette, der Wiederholung von Bindungsstudien mit sensibleren Methoden und der Überprüfung des Redoxverhaltens der Cytochrome beim Wildtyp von Sch. pombe.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Hefestämme

Sch. pombe 972 h⁻ ist der Wildtyp dieser Untersuchungen.

Als Mutante diente das Antimycin-resistente, prototrophe Kreuzungsprodukt aus der Kreuzung der ursprünglich isolierten A N T 8 50 ade 7 h⁻ mit dem Wildtyp.

2. Chemikalien

NADH und Pferdeherz-Cytochrom c wurde von Boehringer, Antimycin von Nutrial Biochemical Corporation und Urografin von Schering bezogen. Die Ubichinone Q-1 und Q-3 stellte freundlicherweise Herr Dr. Solms von der Firma Hoffmann La Roche, Basel, zur Verfügung.

3. Hefezüchtung und Wachstum auf Antimycin

Die Zellen wuchsen in einem Fermenter (Chemap) mit Belüftungsvorrichtung, Sauerstoff - Regeleinheit und Rührwerk bei 80% Sauerstoff - Sättigung (bezogen auf Luft), 200 Upm und 30°C in Glycerin-Flüssigmedium heran. Das Medium enthielt 7% Glycerin, 1% Yeast - Extrakt (Difco), 0,5% Bacto - Pepton (Difco), 0,1% KH₂PO₄ und hatte einen pH von 5,8.

Das Wachstum des Wildtyps und der Mutante in Abhängigkeit von der Antimycin - Konzentration wurde im gleichen Medium in Schüttelröhrchen geprüft und die Zelldichte der Suspension mit einem Eppen-

dorf - Spektralphotometer bei 546 nm bestimmt.

Bei Auftragung der optischen Dichte gegen Zeit ist die Steigung der Wachstumskurve im Bereich 0,5 - 1,5 O.D. direkt proportional der Generationsdauer. Die Generationsdauer selbst, - worunter die Zeit verstanden wird, in deren Verlauf sich der Zelltiter verdoppelt, - wurde während einer Anzucht von Sch. pombe im Fermenter durch Auszählen der Zellen in der Blutzählkammer ermittelt. Der Anteil abgestorbener Zellen betrug weniger als 0,5% pro Generationsdauer und liegt damit unter dem Messfehler der Titerbestimmung.

Die biologische Wirksamkeit von Antimycin im Wachstumsmedium wurde durch den Hemmeffekt von Glycerin - Medium, dem ca. 50 Stunden zuvor 0,05 µg pro ml Antimycin zugegeben wurde, auf die NADH - Oxidase getestet.

4. Isolation Antimycin - resistenter Mutanten

Logarithmisch gewachsene Zellen von 50 ade 7 h⁻ wurden nach Wolf et al. (1971) mit Nitrosoguanidin behandelt. Die Einwirkdauer des Mutagen war 12, 20 und 35 Minuten, sodass 5 %, 10 % und 25% der Zellen diese Prozedur überstanden. Die Überlebensrate wurde anhand der koloniebildenden Einheiten auf Glucoseplatten ermittelt. Die mutagenisierten Hefen wurden in Aliquots aufgeteilt und in Glucosemedium bis zu einem Titer von 10⁷ Zellen pro ml hochgezüchtet. Nach Überimpfen auf Glycerinmedium und ca. 3 Teilungsschritten erfolgte die Zugabe von 5 µg Antimycin pro ml. Die Suspensionen, welche unter diesen Selektionsbedingungen nach ungefähr 2 Wochen Trübung zeigten, wurden auf Antimycin-haltige Glycerinplatten aufgetropft und die hochgewachsenen Kolonien abisoliert.

5. Präparation mitochondrialer Partikel

Die Zellsuspensionen wurden in der frühen stationären Phase bei ca. $1,5 \times 10^8$ Zellen pro ml geerntet, abzentrifugiert (15 min, $3000 \times g$) und in Präparationspuffer (1 mM EDTA, 1,2 M Sorbitol, 10 mM Histidin, pH 6,5) suspendiert (300 g Zellen pro l Puffer). Beim mechanischen Aufschluss durch Schütteln per Hand zusammen mit Glasperlen (je 200 ml Suspension + 800 g Glasperlen von 0,45 mm Durchmesser) waren nach 2 bis 10 min mehr als 70% der Zellen zerplatzt. Die Antimycin-resistenten Stämme waren durchgängig schneller aufschliessbar als der Wildtyp von *Sch. pombe*. Das Zellhomogenat wurde mit Puffer ausgewaschen, abzentrifugiert (20 min, $46\ 000 \times g$), die obere Schicht des Sediments, welche aus mitochondrialen Partikeln besteht, in Präparationspuffer ohne Sorbitol aufgenommen und durch ein Urografin - Kissen (15% Urografin, 1mM EDTA, 10 mM Histidin, pH 7) zentrifugiert (Swing - out - rotor, 1 Stunde, $136\ 000 \times g$). Die lockere Schicht des Pellets, in Präparationspuffer aufgenommen und durch zweimaliges Waschen von Urografin gereinigt, ergab das mitochondriale Protein, mit dem Enzym- und Bindungstests, Extrareduktion des Cytochrom b-566 und Tieftemperatur-Spektren durchgeführt wurden. Für die Bestimmung des Cytochromgehalts musste das Cytochrom c durch Pottern (Elvehjem homogenizer, 2 000 Upm, 3 min) in Gegenwart von Phosphatpuffer ($0,2 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$, pH 7,4) und anschließender Zentrifugation (20 min, $46\ 000 \times g$) aus den mitochondrialen Partikeln extrahiert werden.

6. Enzymatische Tests

Zur Messung der NADH : Cytochrom c-Oxidoreduktase wurde dem Testpuffer (0,1 M KH_2PO_4 , 25 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,1 M Sorbitol, pH 7,4) 0,1 mM oxidiertes Cytochrom c als Elektronenakzeptor zugesetzt und die Reaktion 15 min nach Enzymzugabe mit NADH (1 mM) als Elektronendonator gestartet. KCN (30 μM) verhinderte das Abfließen der Elektronen auf die Endoxidase. Die Reduktion des Cytochrom c wurde in einem Einstrahl-Spektral-photometer (Gilford) bei 550 nm ($\epsilon = 18,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) verfolgt und die Enzymaktivität als Konzentration des Endprodukts pro Zeit und pro Masse Mitochondrienprotein bei 25°C bestimmt. Beim Test auf NADH-Oxidase wurde der Verbrauch von Sauerstoff nach Zugabe von NADH zum Puffer-Proteingemisch in einem geschlossenen Gefäß mit der Clark-Elektrode gemessen. Der Puffer enthielt ebenfalls 0,1 mM oxidiertes Cytochrom c, um das bei der Präparation verlorene zu ersetzen. Bei der Versuchstemperatur von 25°C waren 0,24 μMol Sauerstoff pro ml Puffer gelöst. Die Zugabe von Antimycin und Ubichinonen erfolgte als äthanolische Lösung. Die im Ergebnisteil angegebenen Titer zur vollständigen Hemmung der Enzymtests sind die durch Extrapolation der steilsten Steigung der Hemmkurve auf die Abszisse erhaltenen Werte.

7. Tieftemperatur-Spektroskopie

Der Enzymlösung wurde Antimycin 5 min vor der Zugabe des Substrats zugesetzt. Die Reduktion des mitochondrialen Proteins erfolgte mit NADH oder Dithionit. Nach 10 min Inkubationszeit

wurden Mess- und Referenzproben in flüssigem Stickstoff eingefroren und die Differenzspektren der Cytochrome mit einem Zweistrahl-Spektralphotometer (Cary, Model 17) bei 77°K aufgenommen.

8. Extrareduktion des Cytochrom b-566 und Bestimmung des Cytochromgehalts

Die Konzentration der Cytochrome wurde mit einem Zweiwellenlängen-Spektralphotometer (Aminco-DW-2) bei 25°C ermittelt: Cytochrom b und $\alpha\alpha_3$ als Absorptionsdifferenz zwischen Dithionit-reduzierter und oxidiertem Probe und Cytochrom c_1 als Absorptionsdifferenz zwischen Ascorbat+KCN -reduzierter und oxidiertem Proteinsuspension. Folgende Wellenlängenpaare und Absorptionskoeffizienten dienten als Berechnungsgrundlage:

Cytochrom b, $\epsilon_{563-573} = 25,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Berden und Slater, 1970);

Cytochrom c_1 , $\epsilon_{553-539} = 20,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (ibid);

Cytochrom $\alpha\alpha_3$, $\epsilon_{605-590} = 12,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Norling et al. 1972).

Die Extrareduktion des Cytochrom b-566 wurde als Differenz zwischen der Absorption bei 566 nm und der bei 573 nm gemessen. Zunächst wurde das mitochondriale Protein in Phosphatpuffer durch NADH + KCN reduziert und danach unter kräftigem Rühren Antimycin zugegeben, da sich die zusätzliche Reduktion nur in Anwesenheit von Sauerstoff ausprägt.

9. Bindung von Antimycin an mitochondriale Partikel

Für die Bindungsstudien wurde der gleiche Puffer wie für die enzymatischen Messungen, allerdings ohne Cytochrom c, verwendet. Die Methode von Berden und Slater (1972) wurde folgendermassen variiert: Um extrem kleine Dissoziationskonstanten (10^{-13} molar) zu bestimmen, wurde die Konzentration des Serumalbumin, dessen Anwesenheit während der Reaktion vorgeschrieben ist, erhöht. Für die Ermittlung von Konstanten im Bereich von 10^{-9} molar wurde der Bindungstest ohne Serumalbumin durchgeführt. Erst nach Abzentrifugieren der mitochondrialen Partikel samt gebundenem Hemmstoff wurde das Albumin dem Überstand zugesetzt, um die Konzentration des ungebundenen Antimycin im Eppendorf - Fluorimeter bestimmen zu können. Die Bindungsparameter wurden nach der graphischen Methode (Rosenthal, 1967) ermittelt.

10. Proteinbestimmung

Vor der Proteinbestimmung (Lowry et al., 1951) musste das Urografin, das diesen Test verfälscht, durch Säulenchromatographie über Bio - Gel A - 5 entfernt werden.

III. ERGEBNISSE

1. Isolation Antimycin - resistenter Mutanten

UV - Bestrahlung und Behandlung mit dem Kanzerostatikum ICR 170 führten zu keiner Antimycin - resistenten Mutante. Auch die Suche nach spontan entstandenen, resistenten Hefezellen blieb erfolglos. Nach ^{32}P - Einbau konnten 2 Mutanten isoliert werden, die in vivo resistent, aber in vitro sensibel waren. Erst die Induktion mit Nitrosoguanidin erbrachte, ausgehend von 4×10^8 Zellen, insgesamt 8 in vitro resistente Mutanten, von denen 6 annähernd die Wachstumsgeschwindigkeit des Wildtyps erreichen. Eine dieser schnell wachsenden Mutanten ist A N T 8, die im folgenden näher untersucht wird.

2. Wachstum auf Antimycin

Züchtet man Wildtyp - Zellen von Sch. pombe auf vergärbarem Substrat wie z.B. Glucose, so wirkt sich Antimycin nicht hemmend auf die Zellvermehrung aus. In Flüssigmedium mit Glycerin, einem Substrat, das nur veratmet wird, unterbindet bereits eine Konzentration von $0,05 \mu\text{g}$ Antimycin pro ml das Wachstum des Wildtyps. Das Wachstum der Mutante wird nicht beeinträchtigt (Abb.1,2). Um die Zellteilungsrate um 25% zu erhöhen (Abb.1, zwischen $\blacktriangle$ und $\blacklozenge$; Abb.2, $\blacksquare$), wird bei der Mutante die 1000 - fache Menge Antibiotikum benötigt, wie beim Wildtyp. Eine signifikante Abnahme der biologischen Wirksamkeit des Hemmstoffes im zellfreien Wachstumsmedium war während der Zeitdauer der Wachstumsversuche nicht zu beobachten.

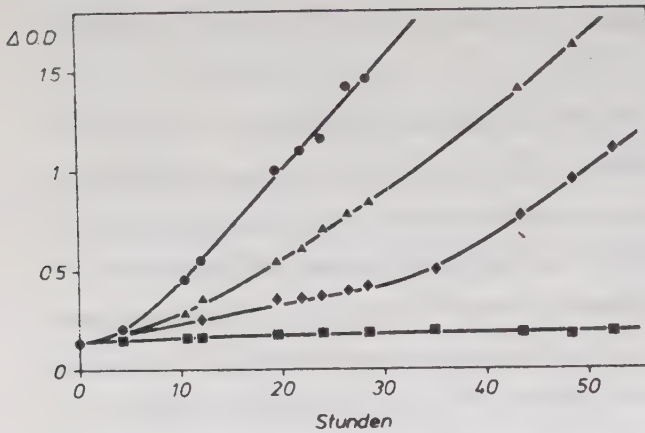


Abb. 1:

Vermehrung der Zellen des Wildtyps 972 h⁻ auf Antimycin in Glycerinmedium; bestimmt als Veränderung der optischen Dichte bei 546 nm. Zu 10^6 Zellen pro ml wurden ● 0,000; ▲ 0,003; ◆ 0,011; ■ 0,05 μg Antimycin pro ml Suspension hinzugefügt.

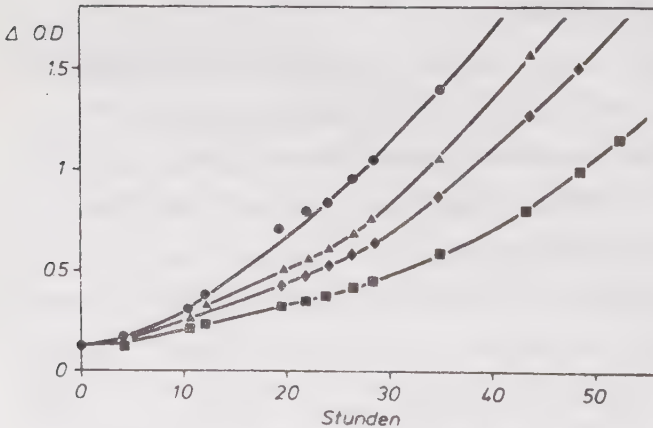


Abb. 2:

Vermehrung der Zellen der Mutante A N T 8 auf Antimycin in Glycerinmedium; bestimmt wie in der Legende zu Abb. 1 angegeben. Zu 10^6 Zellen pro ml wurden ● 0,0; ▲ 0,1; ◆ 0,6; ■ 10 μg Antimycin pro ml Suspension hinzugefügt.

In Glycerinmedium bei 80 % Sauerstoffsättigung beträgt die Generationsdauer des Wildtyps ca. 5 und von A N T 8 ca. 6 Stunden. Der maximal erreichbare Zelltitel ist bei der Mutante nur etwa halb so gross wie beim Wildtyp (2 bis 3 bzw. 5×10^8 Zellen pro ml).

3. Präparation mitochondrialer Partikel

Bei der Präparation mitochondrialer Partikel treten auf jeder Stufe der in METHODEN beschriebenen Prozedur auffällige Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante auf. Für den Zellaufschluss ist ein Charakteristikum von A N T 8 von Bedeutung, nämlich die Fragilität ihrer Zellen. Sie platzen bereits während der Züchtung im Fermenter, wenn zu heftig gerührt wird (200 Upm). Im Gegensatz zum Wildtyp, der bis 1000 Upm ohne Zellbruch übersteht, trennen sich die Zellen von A N T 8, wegen des vorsichtigen Rührens unter Standardbedingungen (200 Upm), nach Teilung nicht. Auch bilden sie insbesondere bei saurem pH - Wert (ab ca. 5) Verklumpungen. Wird eine Zellsuspension der Mutante etwa 5 Minuten ungestört stehen gelassen, so sedimentieren die lebenden Zellen. Dadurch ist ihre Abtrennung von den im Überstand verbleibenden, abgestorbenen oder geplatzten Zellen leicht möglich.

Im Ausmass der Zellatmung mit Glucose (bezogen auf das Nassgewicht der Hefe), ergibt sich keine Differenz zwischen beiden Stämmen. Allerdings zeigt sich nach Aufschluss der Zellen, dass die Ausbeute an innerer Mitochondrienmembran bei A N T 8 grösser ist, aber die spezifische Aktivität der NADH - Oxidase (= Leitenzym) um ca. 30% niedriger liegt als beim Wildtyp.

Werden die mitochondrialen Partikel nicht, wie in METHODEN beschrieben, durch ein Urografinkissen, sondern in einem Urografin-gradienten zentrifugiert, dann weicht das Verteilungsmuster des Mutanten - Materials von dem des Wildtyp - Materials ab. Während die mitochondrialen Partikel des Wildtyps im Bereich zwischen 15 und 18% Urografin zu finden sind, sammeln sie sich bei A N T 8 in der Zone zwischen 10 bis 18% Urografin an. Der Anteil des Mutantenproteins geringerer Dichte (10 - 15%), das auch eine niedrigere spezifische Aktivität der NADH - Oxidase aufweist im Vergleich zu dem höherer Dichte, nimmt zu, wenn die Wachstumsbedingungen schlechter werden (zu wenig Glycerin oder O_2 , falscher pH). Eine ähnliche Dichte- und Aktivitätsverteilung im Gradienten ist auch bei dem unter suboptimalen Bedingungen gezüchteten Wildtyp von *Sch. pombe* zu beobachten, wenngleich nicht in so ausgeprägtem Masse wie bei A N T 8.

Da die mitochondrialen Partikel der Mutante im Gradientenbereich von 10 bis 18% bezüglich ihrer spezifischen Aktivität des Marker-enzym nicht einheitlich sind, wird auch bei A N T 8 nur das Protein ausgewählt, welches sich wie das des Wildtyps zwischen 15 und 18% Urografin befindet : Diese Fraktion entspricht in Dichte und spezifischer Aktivität der NADH - Oxidase der lockeren Schicht des Pellets bei Zentrifugation der mitochondrialen Partikel durch das Urografinkissen (siehe METHODEN, S.13).

4. Hemmung der NADH - Oxidase mit Antimycin

Im NADH - Oxidasetest fließen die Elektronen vom extern zugegebenen Substrat NADH über die NADH - Dehydrogenase, das Ubichinon-6, das bc_1 - Segment und das Cytochrom c zur End-oxidase, wo Sauerstoff zu Wasser reduziert wird. Der Sauerstoff-

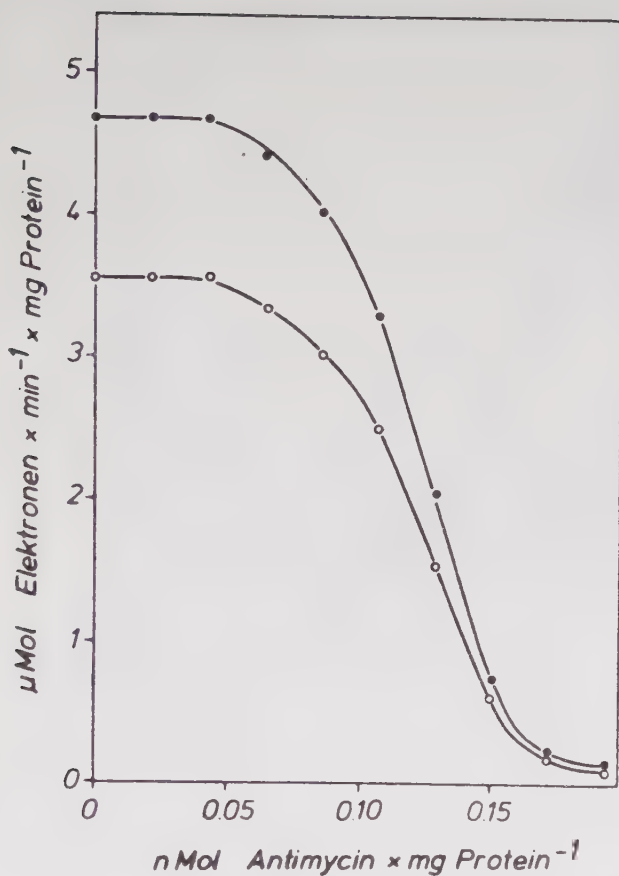


Abb. 3:

Hemmung der NADH - Oxidase des Wildtyps mit Antimycin.

Die Enzymaktivität wurde aus dem Sauerstoffverbrauch ermittelt.

Konzentration des mitochondrialen Proteins: 75 μ g pro 2 ml Test-

volumen. o, unstimuliert; •, mit 26 μ molar Ubichinon-3 stimuliert.

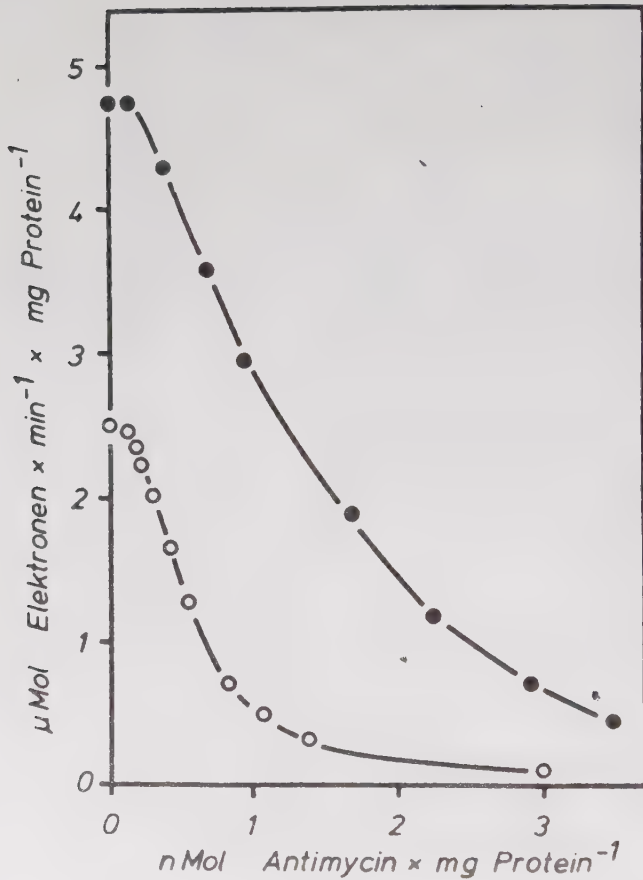


Abb. 4:

Hemmung der NADH - Oxidase der Mutante A N T 8 mit Antimycin. Die Enzymaktivität wurde wie in der Legende zu Abb. 3 beschrieben, bestimmt. Konzentration des mitochondrialen Proteins: 138 μg pro 2 ml Testvolumen. o, unstimuliert; •, mit 26 μmolar Ubichinon-3 stimuliert.

verbrauch wird polarographisch gemessen. Dieser Test umfasst, ausser der Succinat - Dehydrogenase, alle Atmungskettenkomplexe.

Wird die NADH - Oxidase - Aktivität mit Antimycin titriert, so nimmt sie in beiden Stämmen einer sigmoidalen Kurve folgend ab (Abb. 3,4). Um 50 % Hemmung zu erreichen, muss dem mitochondrialen Protein von A N T 8 mehr als die 3-fache Konzentration des Antibiotikums zugesetzt werden als beim Wildtyp; Eine 80 % ige Hemmung erfordert die 6-fache Konzentration.

Die NADH - Oxidase - Aktivität lässt sich mit synthetischem Ubichinon-3 erhöhen. Im Wildtyp ist die gesteigerte Aktivität ebenso sensibel gegen das Antibiotikum wie die unstimulierte Aktivität: in beiden Fällen ist der Elektronentransport nach Zugabe von 0,15 nMol Antimycin pro mg Protein blockiert*. Wird die NADH - Oxidase von A N T 8 mit Ubichinon-3 stimuliert, verringert sich der Hemmeffekt von Antimycin mit steigender Konzentration an Ubichinon. In Anwesenheit von 26 µmolar Ubichinon-3 erfordert die 80 % ige Hemmung der NADH - Oxidase 2,4 mal mehr Antibiotikum als ohne Ubichinon.

5. Hemmung der NADH : Cytochrom c - Oxidoreduktase mit Antimycin

Der NADH : Cytochrom c - Oxidoreduktasetest umfasst Komplex I und Komplex III der Atmungskette. Da die Cytochrom c - Oxidase mit KCN blockiert ist, fliessen die Elektronen vom NADH über die NADH - Dehydrogenase, das Ubichinon-6 und das

* Berden und Slater (1972) geben an, dass die Succinat - Oxidase mitochondrialer Partikel von Rinderherz durch 0,35nMol Antimycin pro mg Protein inaktiviert wird. Kröger und Klingenberg (1973) berichten von 0,29nMol Antimycin pro mg Protein zur Hemmung der NADH - Oxidase desselben Ausgangsmaterials. Bei mitochondrialen Partikeln, gewonnen aus *C. utilis* ist die NADH - Oxidase nach Zugabe von ca. 0,09nMol Antimycin pro mg Protein gehemmt (Grimmelikhuijzen und Slater, 1973).

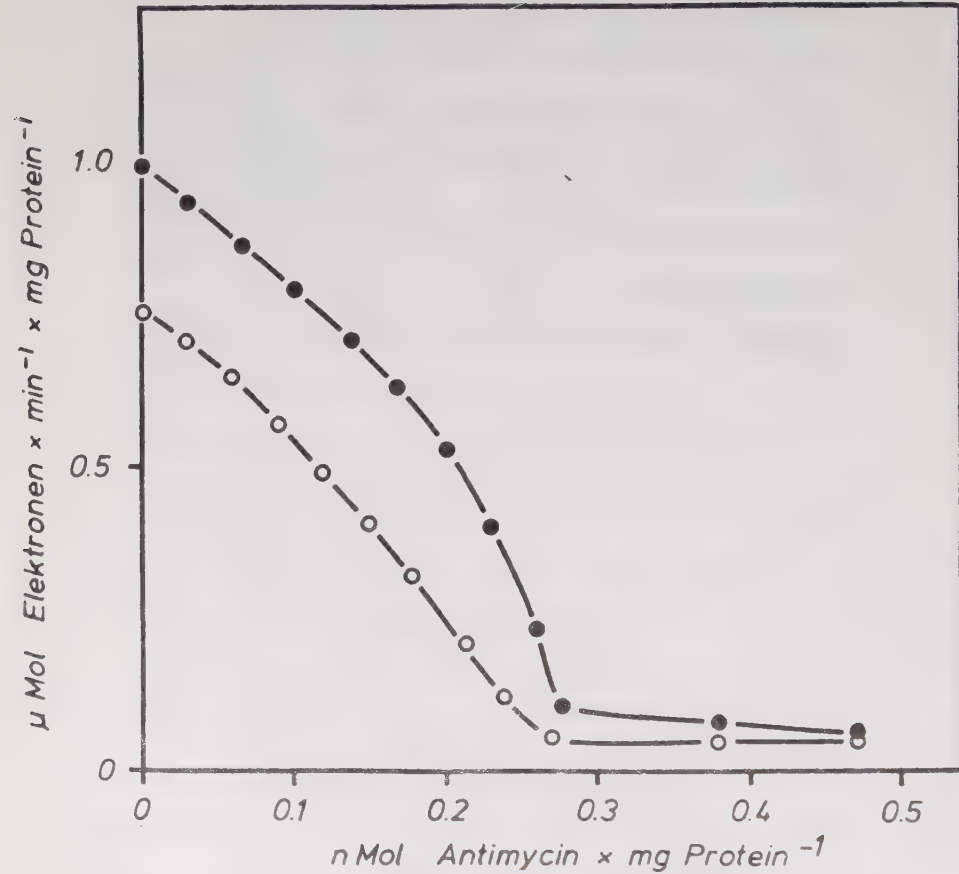


Abb. 5:

Hemmung der NADH : Cytochrom c - Oxidoreduktase des Wildtyps mit Antimycin. Die Enzymaktivität wurde anhand der Cytochrom c - Reduktion ermittelt. Konzentration des mitochondrialen Proteins: 5 μg pro 2 ml Testvolumen. o, unstimuliert; •, stimuliert mit 26 μmolar Ubichinon-3.

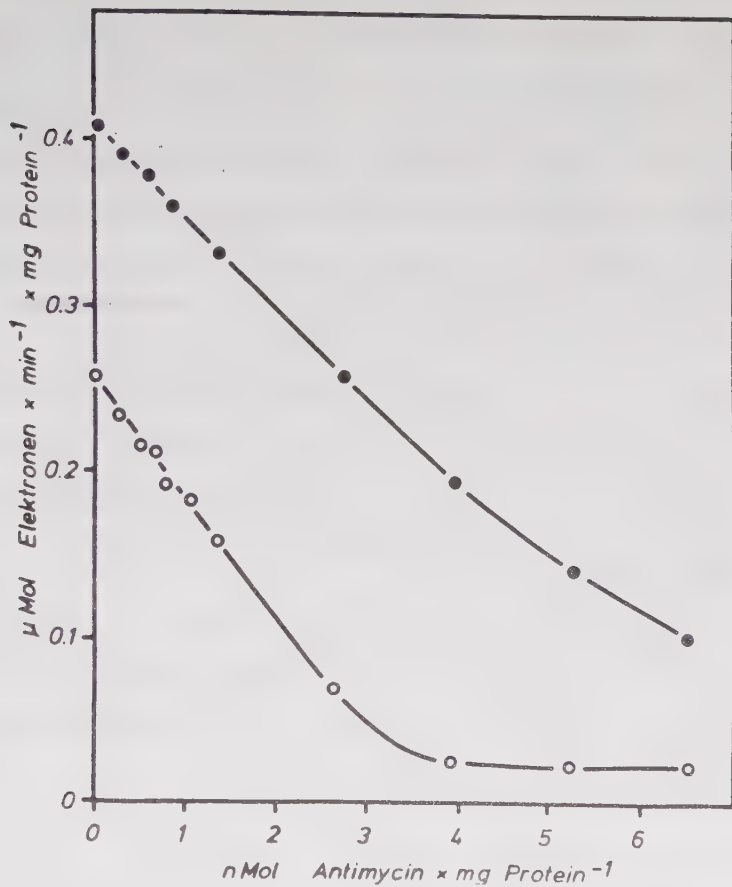


Abb. 6:

Hemmung der NADH : Cytochrom c - Oxidoreduktase der Mutante A N T 8 mit Antimycin. Die Enzymaktivität wurde wie in der Legende zu Abb. 5 angegeben, bestimmt. Konzentration des mitochondrialen Proteins: 14 μ g pro 2 ml Testvolumen.

o, unstimuliert; •, stimuliert mit 26 μ molar Ubichinon-3.

bc₁ - Segment nur bis zum extern zugegebenen Cytochrom c, dessen Reduktion spektroskopisch gemessen wird.

Beim Wildtyp ist die Antimycin - Effektkurve schwach sigmoidal bis hyperbolisch. 0,3 nMol Antimycin pro mg Protein reichen aus, um die NADH : Cytochrom c - Oxidoreduktase zu hemmen (Abb. 5)*. Der Vergleich dieser Konzentration mit derjenigen, welche zur Hemmung der NADH - Oxidase benötigt wurde, ergibt, dass beim Elektronentransport auf Cytochrom c zur Erzielung der gleichen Hemmwirkung ungefähr doppelt soviel Antimycin zugefügt werden muss, wie beim Elektronentransport auf Sauerstoff.

Die Antimycin - Effektkurve der NADH : Cytochrom c - Oxidoreduktase von A N T 8 verläuft hyperbolisch. Bei ca. 3 nMol Antibiotikum pro mg Protein ist die enzymatische Aktivität gehemmt (Abb. 6). Wiederum die Hälfte davon blockiert die NADH - Oxidase der Mutante.

Ubichinon-3 wirkt auf die NADH : Cytochrom c - Oxidoreduktase ähnlich stimulierend wie auf die NADH - Oxidase. In Wildtyp und Mutante wird die Aktivität erhöht. In A N T 8 wird zusätzlich der Effekt von Antimycin abgeschwächt.

6. Bindung von Antimycin an mitochondriale Partikel

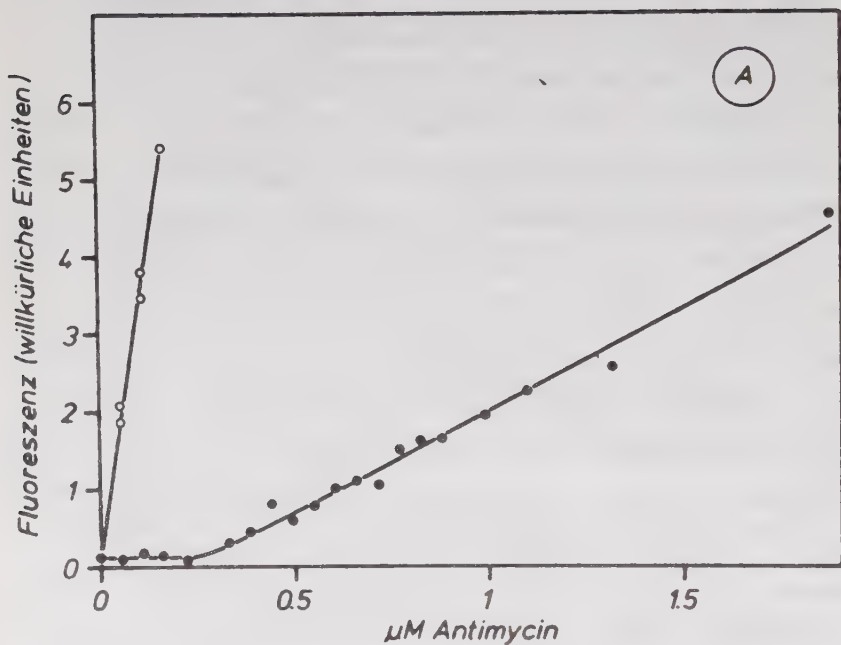
Der Bindungstest wird vorgenommen, indem zu einer Suspension mitochondrialer Partikel in Puffer Antimycin gegeben und nach Gleichgewichtseinstellung sowohl der Protein - Antibiotikum - Komplex, als auch das freie Protein durch Zentrifugation

* Bei mitochondrialen Partikeln von Rinderherz ist die Succinat - Cytochrom c - Oxidoreduktase nach Zugabe von ca. 0,35 nMol Antimycin pro mg Protein inaktiviert. Sowohl für die NADH - Cytochrom c - Oxidoreduktase desselben Ausgangsmaterials, als auch für die Succinat - oder NADH - Cytochrom c - Oxidoreduktase bei mitochondrialen Partikeln von Candida wurden keine entsprechenden Angaben gefunden.

abgetrennt werden. Das ungebundene Antimycin bleibt im Überstand und seine Konzentration lässt sich fluorimetrisch bestimmen. Serumalbumin wird entweder zum Reaktionsgemisch oder nach dem Zentrifugationsschritt dem Überstand zugegeben. Diese Substanz erhöht die Fluoreszenzausbeute des Antimycin nach Bildung eines Serumalbumin - Antimycin - Komplexes. Zur Bestimmung extrem kleiner Dissoziationskonstanten ist Serumalbumin während der Reaktion anwesend. Dabei setzt es zusätzlich durch Konkurrenz mit dem mitochondrialen Protein die Bindungsfestigkeit des Antibiotikum an die mitochondrialen Partikel herab. Deshalb muss in diesem Falle die gemessene Dissoziationskonstante für die Bindungskapazität des Serumalbumin korrigiert werden (Berden und Slater, 1972).

Die mitochondrialen Partikel analog durchgeführter Proteinpräparationen enthalten aufgrund des beschriebenen Reinigungsschrittes relativ konstante Konzentrationen an Bindungsstellen bezogen auf die Masse Protein. Ausserdem entfernt diese Prozedur Membrankomponenten, die sich bei ungereinigtem Material während des Bindungstests von den Partikeln ablösen und die fluorimetrische Messung beeinträchtigen.

Die Konzentration des gebundenen Hemmstoffes lässt sich aus der Differenz der Konzentration des eingesetzten minus der fluorimetrisch bestimmten Konzentration des freien Antibiotikum errechnen. Aus dem Verhältnis von gebundenem und freiem Antimycin können anhand eines graphischen Versuch- und Irrtum-Verfahrens die Dissoziationskonstanten und die Konzentrationen an Bindungsstellen, bezogen auf die Menge mitochondrialen Proteins, ermittelt werden. Die hier angewandte Parameter-



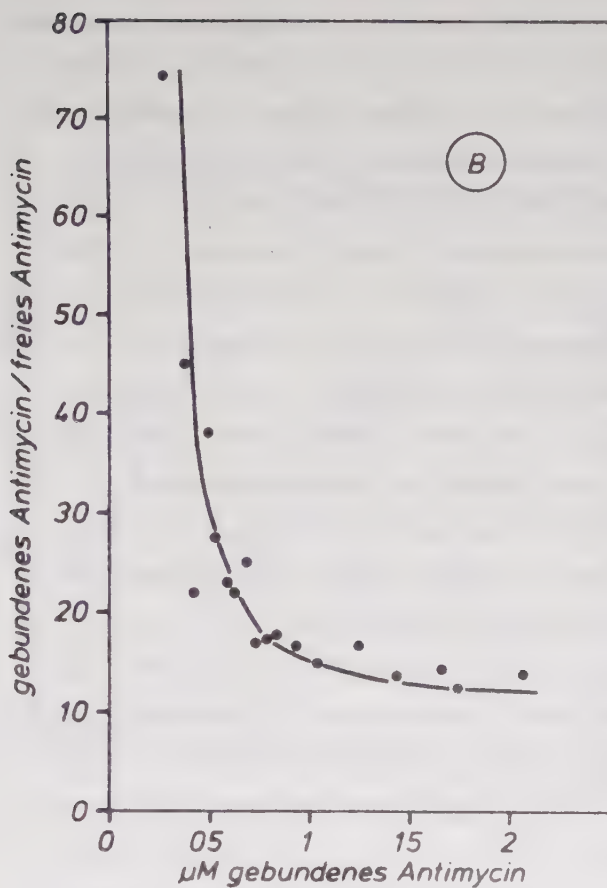


Abb. 7B:

Scatchardplot der Bindungskurve. •, umgerechnete Daten aus (A). Die Linie ist die theoretische Hyperbel aus 3 Bindungsstellen mit folgenden Parametern: Dissoziationskonstante $K_{D1} = 1 \times 10^{-11}$ molar, $K_{D2} = 3 \times 10^{-9}$ molar, K_{D3} ca. 10^{-4} molar; Konzentration $N_1 = 150$ pMol pro mg Protein, $N_2 = 100$ pMol pro mg Protein, N_3 ca. 70 nMol pro mg Protein.

fitting - Methode hat das Scatchard - Bindungsmodell (Scatchard, 1949) zur Grundlage, welches voneinander unabhängige, nicht kooperative Bindungsstellen annimmt. Werden die Bindungsstellen jedoch durch den Liganden induziert, oder beeinflussen sie sich untereinander, kann, aber muss sich dies nicht in einer Inkonsistenz mit dem Scatchard - Modell ausdrücken. Im Falle der Unverträglichkeit der Daten mit dem Scatchard - Modell sind die Bindungsparameter nur durch ein umfangreiches Computerprogramm (Fletcher und Spector, 1970) zu ermitteln, welches das stepwise equilibrium - Modell (Klotz, 1974) zur Grundlage hat (beide Modelle sind im Anhang dargestellt).

In Abb. 7A ist eine Bindungskurve des Antimycin an mitochondriale Partikel des Wildtyps gezeigt. Die Auftragung der Testpunkte im Scatchardplot (Konzentration des gebundenen Liganden, dividiert durch die Konzentration des freien Liganden, aufgetragen gegen die Konzentration des gebundenen Liganden) ergibt eine hyperbolische Kurve (Abb. 7B). Unter der Annahme voneinander unabhängiger Bindungsstellen muss sich deshalb Antimycin an mehr als einem Ort des mitochondrialen Proteins anlagern. Zunächst wurde das graphische Parameter - fitting mit 1 spezifischen ($K_D \leq 10^{-9}$ molar) und 1 unspezifischen ($K_D = 10^{-7}$ molar) Dissoziationskonstanten versucht. Doch konnte die theoretische Kurve erst dann mit den Messdaten in Übereinstimmung gebracht werden, als zusätzlich eine 2. spezifische Bindungsstelle eingeführt wurde. Die Parameter der bestpassenden Funktion sind $K_{D1} = 1 \times 10^{-11}$ molar, $K_{D2} = 3 \times 10^{-9}$ molar, K_{D3} ca. 10^{-4} molar; $N_1 = 150$ pMol pro mg Protein, $N_2 = 100$ pMol pro mg Protein, N_3 ca. 70 nMol pro mg

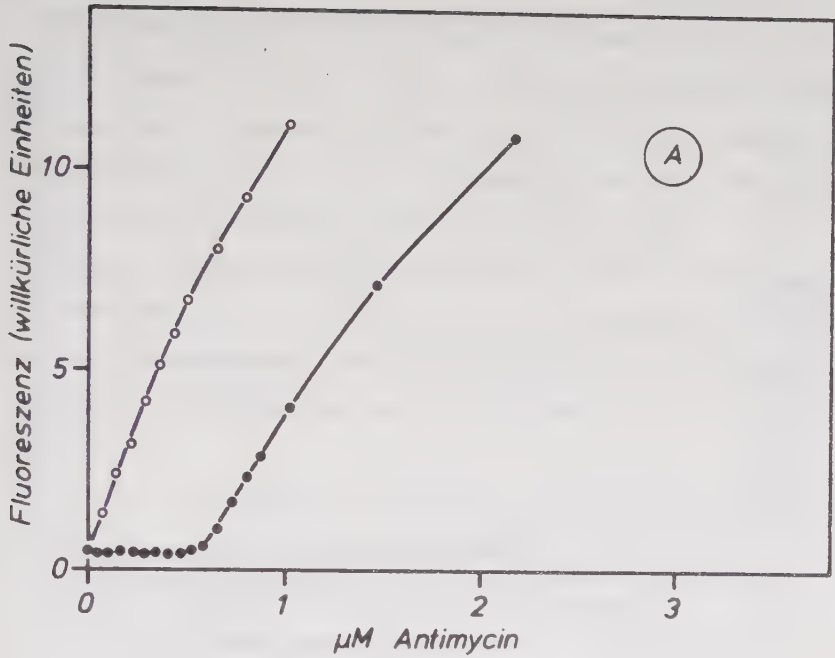


Abb. 8A:

Bindung von Antimycin an mitochondriale Partikel des Wildtyps in Anwesenheit von Serumalbumin. Versuchsbedingungen wie in der Legende zu Abb. 7A beschrieben. Konzentration des mitochondrialen Proteins: 9,55 mg pro 2,5 ml Testvolumen. Konzentration von Serum Albumin: 10 mg pro ml. o, Standardkurve; •, Testkurve.

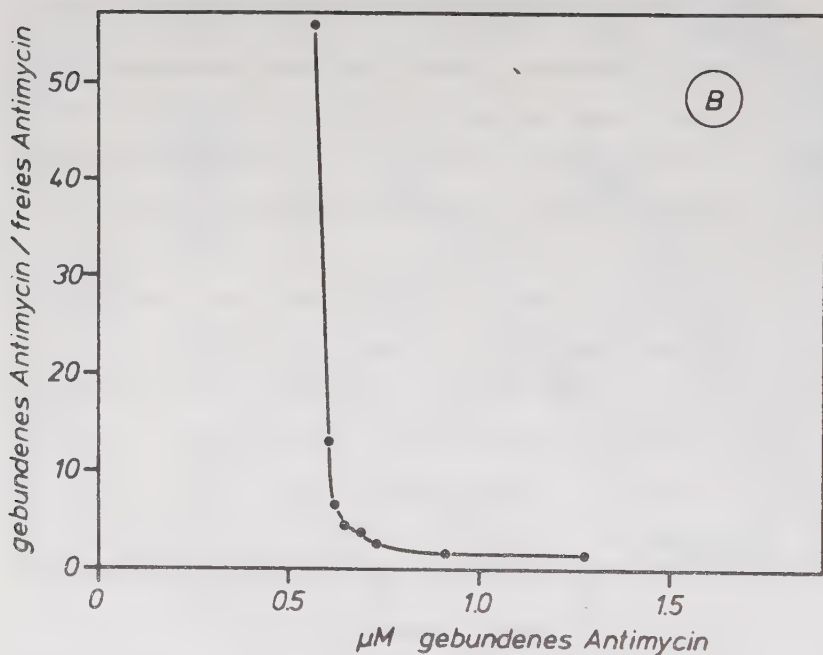


Abb. 8 B:

Scatchardplot der Bindungskurve. ●, umgerechnete Daten aus (A). Die Linie verbindet diese Punkte. Aus der steilsten Steigung dieser Kurve errechnet sich eine Dissoziationskonstante $K_D \text{ app. } 1 / 6 \times 10^{-10} \text{ molar}$. Nach Korrektur für die Konkurrenz des Serumalbumin ergibt sich die reale Dissoziationskonstante $K_{D1} \leq 4 \times 10^{-13} \text{ molar}$.

Protein. (N_1 ist die Konzentration der Bindungsstelle mit der Dissoziationskonstanten K_{D1}).

Um die K_{D1} genauer zu bestimmen, wurde ein Bindungstest in Anwesenheit hoher Konzentration von Serumalbumin durchgeführt (Abb. 8A,8B). Werden die bereits ermittelten Parameter für die Bindungsstelle 2 (A_2) und die unspezifische Bindungsstelle herangezogen, so ergibt sich keine gute Übereinstimmung zwischen der theoretischen Kurve und den Messpunkten. Dies ist vermutlich auf die auf Näherungen beruhende Korrektur für die Konkurrenz des Serumalbumin zurückzuführen. Deshalb wurde die steilste Steigung der Scatchard - Kurve zur Berechnung der ersten Dissoziationskonstante benutzt. Die auf diese Weise ermittelte Konstante muss grösser als die wirkliche sein: $K_{D1} \leq 4 \times 10^{-13}$ molar.

Bei A N T 8 existieren ebenfalls zwei spezifische, jedoch untereinander ähnlich starke Bindungsstellen für Antimycin. Ihre Dissoziationskonstanten und Konzentrationen sind:
 $K_{D1} = 1 \times 10^{-10}$ molar, $K_{D2} = 5 \times 10^{-10}$ molar; $N_1 = 65$ pMol pro mg Protein, $N_2 = 140$ pMol pro mg Protein. Auch hier wurde eine unspezifische, lipophile Bindung des Antibiotikum an die mitochondrialen Partikel gefunden. Der Scatchardplot (Abb. 9B) des Bindungstests ohne Serumalbumin (Abb. 9A) lässt sich mit einer errechneten Kurve, der 1 spezifische ($K_D = 2,4 \times 10^{-10}$ molar, $N = 210$ pMol pro mg Protein) und 1 unspezifische Bindungsstelle zugrunde liegen, annähernd so gut zur Deckung bringen, wie mit der in Abb. 9B eingezeichneten theoretischen Hyperbel aus 2 spezifischen Bindungsstellen. Erst im Versuch in Anwesenheit von Serumalbumin (Abb. 10A,10B)

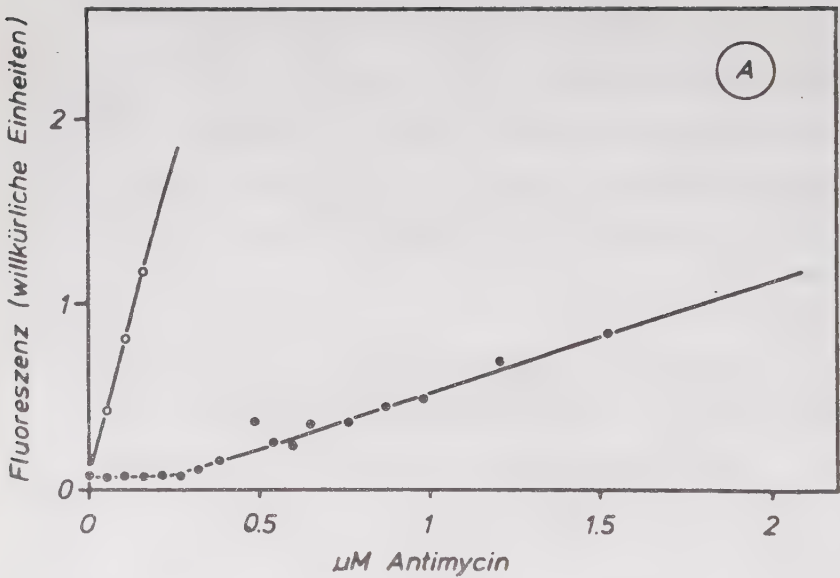


Abb. 9 A:

Bindung von Antimycin an mitochondriale Partikel von A N T 8. Versuchsbedingungen wie in der Legende zu Abb. 7 beschrieben. Konzentration des mitochondrialen Proteins: 4,35 mg pro 3,3 ml Testvolumen. o, Standardkurve; ●, Testkurve.

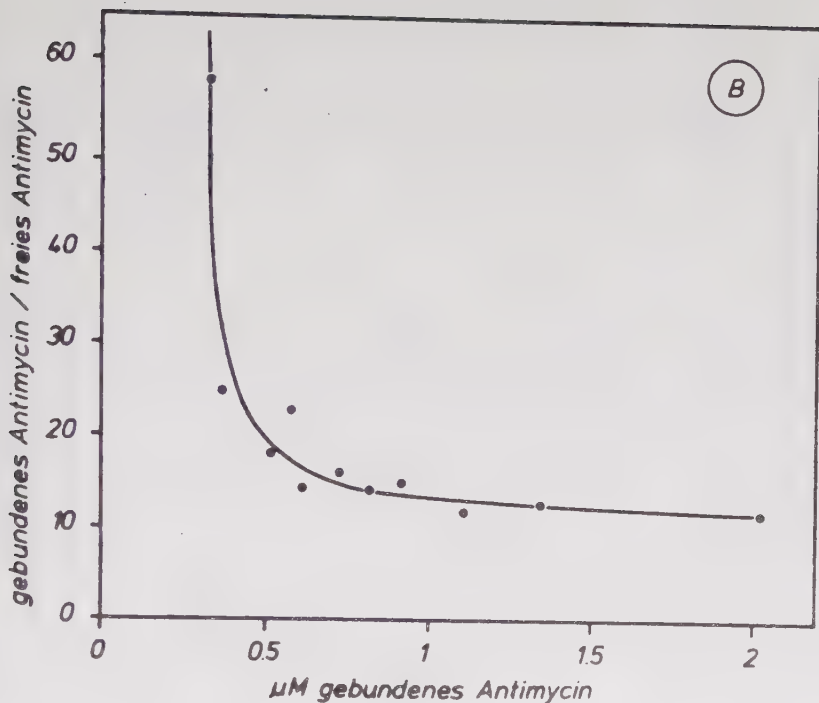


Abb. 9B:

Scatchardplot der Bindungskurve. •, umgerechnete Daten aus (A). Die Linie ist die theoretische Hyperbel aus 3 Bindungsstellen mit folgenden Parametern: Dissoziationskonstante $K_{D1} = 1 \times 10^{-10}$ molar, $K_{D2} = 5 \times 10^{-10}$ molar; Konzentration $N_1 = 65$ pMol pro mg Protein, $N_2 = 140$ pMol pro mg Protein; unspezifische Bindungsstelle wie beim Wildtyp.

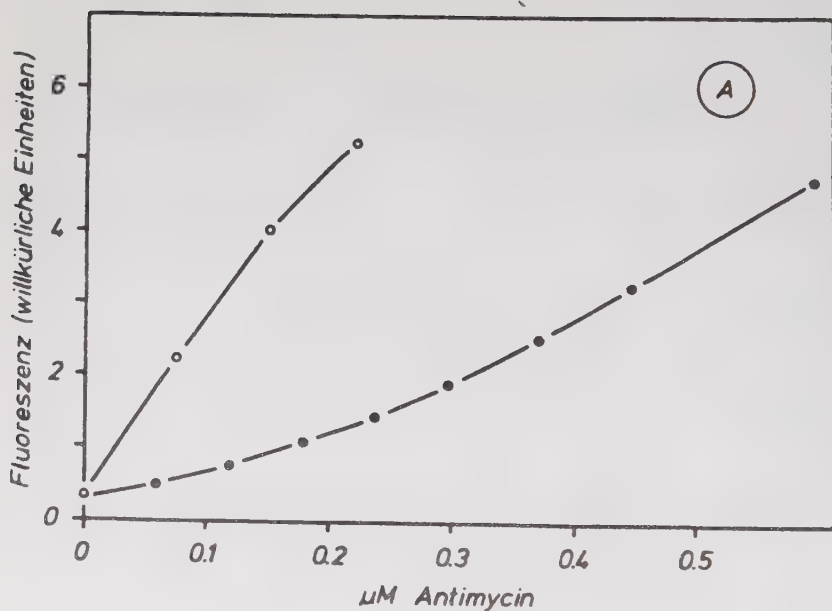


Abb. 10A:

Bindung von Antimycin an mitochondriale Partikel von A N T 8 in Anwesenheit von Serumalbumin. Versuchsbedingungen wie in der Legende zu Abb. 7A angegeben. Konzentration des mitochondrialen Proteins: 5,9 μg pro 2,5 ml Testvolumen. Konzentration von Serum Albumin: 2 μg pro ml. o, Standardkurve; •, Testkurve.

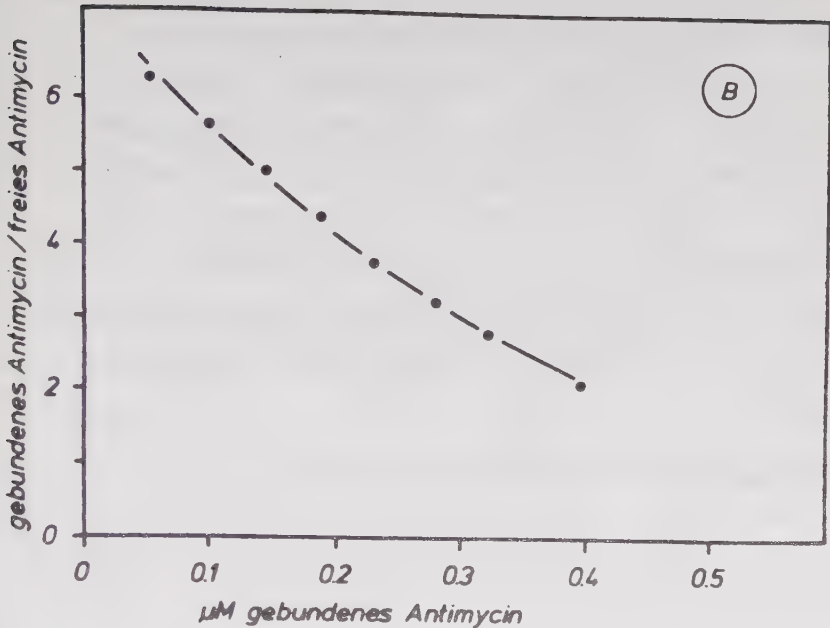


Abb. 10B:

Scatchardplot der Bindungskurve. e, umgerechnete Daten aus (A). Die Linie ist die theoretische Hyperbel aus 3 Bindungsstellen mit folgenden Parametern: Dissoziationskonstante $K_D \text{ app.1} = 3 \times 10^{-9}$ molar, $K_D \text{ app.2} = 1,5 \times 10^{-8}$ molar; Konzentration N_1 und N_2 wie in der Legende zu Abb. 9B. Unspezifische Bindung wie beim Wildtyp. Nach Korrektur der Dissoziationskonstanten für die Konkurrenz des Serumalbumin ergeben sich die realen Dissoziationskonstanten wie in der Legende zu Abb. 9B angegeben.

können eindeutig 2 hochaffine Bindungsstellen unterschieden werden.

7. Cytochromgehalt des mitochondrialen Proteins

Der Gehalt der Mitochondrien an Cytochrom aa_3 ist in Wildtyp und Mutante abhängig von den Zuchtbedingungen bzw. von der Sauerstoffsättigung des Mediums. Konstant dagegen ist die Konzentration von Cytochrom b und c_1 und ihr quantitatives Verhältnis zur Konzentration an Bindungsstellen für Antimycin. In Tabelle 1 ist der Cytochromgehalt und dessen Verhältnis zu den Bindungsstellen charakteristischer Mitochondrienpräparationen zusammengestellt. Das Medium, in dem das Ausgangsmaterial gezüchtet wurde, war zu 80 % mit Sauerstoff gesättigt.

TABELLE 1

Cytochromgehalt und sein Verhältnis zu den Konzentrationen der Bindungsstellen für Antimycin bei Sch. pombe*.

	Cytochrom b	Cytochrom c_1	Cytochrom aa_3	N_1	N_2
Wildtyp absolut ⁺	496	185	452	150	100
pro N_1	3,3	1,3	3	1	0,7
A N T 8 absolut ⁺	495	152	622	65	140
pro N_1	6,6	2,3	9,4	1	2,1
pro N_2	3,3	1,1	4,4	0,5	1

⁺ angegeben in pMol pro mg Protein

* Berden und Slater (1970) fanden bei mitochondrialen Partikeln von Rinderherz eine Stöchiometrie von Cytochrom b zu Antimycin - Bindungsstellen wie 2 : 1. Die Konzentration an Bindungsstellen ist 280 pMol pro mg Protein. Bei mitochondrialen Partikeln von C. utilis wies Grimmelikhuijzen und Slater (1973) ein Verhältnis von 330 pMol Cytochrom b pro mg Protein zu 130 pMol Antimycin - Bindungsstellen pro mg Protein nach.

8. Cytochromspektren bei 77°K

Bei der Cytochromspektroskopie wird die Absorptionsdifferenz zwischen einer reduzierten und einer oxidierten Proteinsuspension gemessen, unter kontinuierlicher Änderung der eingestrahlichten Wellenlänge von 630 nm bis 500 nm. Als Zeichen für die Intaktheit der mitochondrialen Atmungskettenenzyme gilt dabei die Reduzierbarkeit der b - Cytochrome, durch natürliches Substrat im anaeroben Zustand im Vergleich zur nicht - enzymatischen Totalreduktion mit Dithionit. Der Anteil an denaturiertem Cytochrom ist durch die Kohlenmonoxid - Reaktivität angezeigt. In guten Präparationen mitochondrialer Partikel des Wildtyps und der Mutante reduziert NADH ca. 50 % der b - Cytochrome und ungefähr 5 % reagieren mit Kohlenmonoxid. Nach Zugabe von NADH oder Dithionit erscheinen im Wildtyp die Banden von b - Typ - Cytochromen bei 560,2 nm und 554,5 nm (Abb. 11). Antimycin plus Sauerstoff ruft eine zusätzliche Reduktion ("Extraréduktion") hervor: Das Absorptionsmaximum bei 560,2 nm wird um 0,8 nm ins Rotwellige verschoben und seine Höhe ungefähr verdoppelt. Dieser Effekt wurde erstmals von Chance (1958) bei Rinderherzmitochondrien beobachtet.

A N T 8 zeigt bereits nach NADH - Reduktion eine Bande bei 561 nm. Zwischen 561 nm und 554,5 nm befindet sich im Spektrum ein im Vergleich zum Wildtyp tieferer Trog. Antimycin plus Sauerstoff verursacht keine Verschiebung des Absorptionsmaximums bei 561 nm, sondern nur die Verdopplung dessen Höhe (Abb.12).

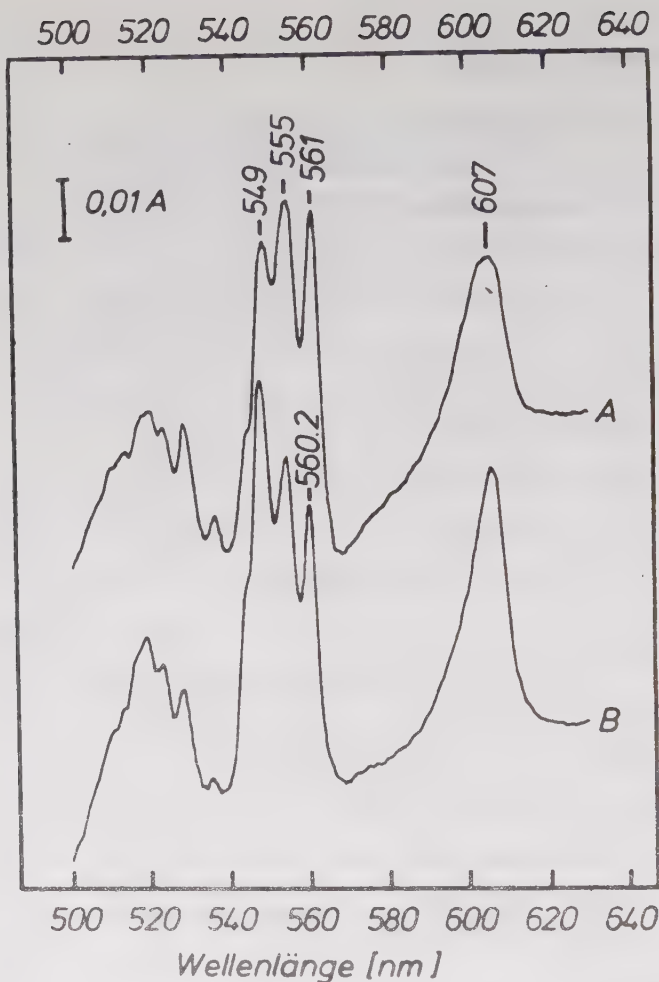


Abb. 11:

Differenzspektren NADH - reduzierter mitochondrialer Partikel von Wildtyp und Mutante bei 77°K. Die Testproben wurden mit 2 mmolar NADH reduziert, die Referenzproben mit 0,2 mmolar $K_3Fe(CN)_6$ oxidiert.

Spektrum (A) Mutante A N T 8. Konzentration des mitochondrialen Proteins: 6,9 mg pro ml.

Spektrum (B) Wildtyp. Konzentration des mitochondrialen Proteins : 6,5 mg pro ml.

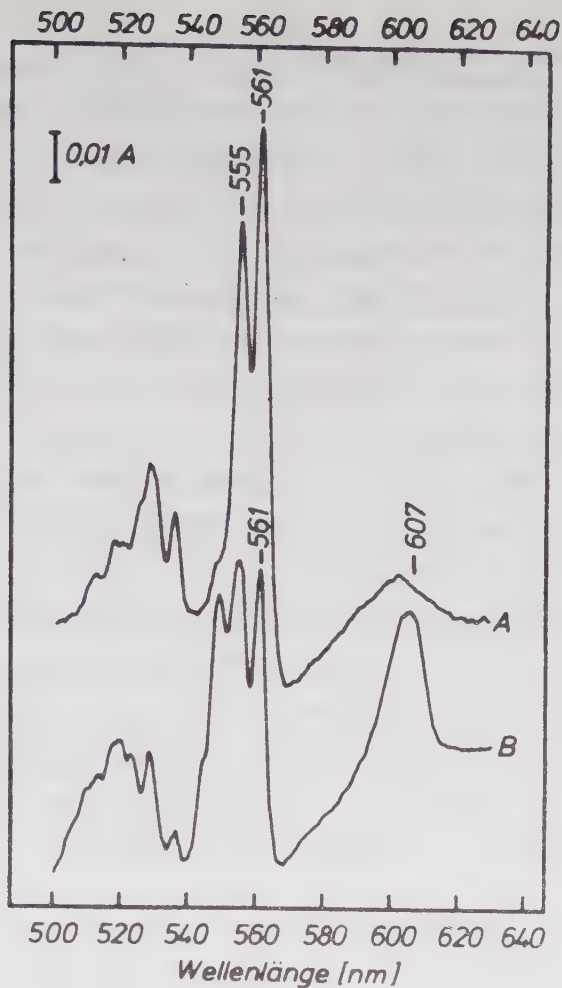


Abb. 12:

Differenzspektren NADH - reduzierter mitochondrialer Partikel der Mutante A N T 8 bei 77°K.

Spektrum (A) in Gegenwart von Antimycin. 6,9 mg Protein wurden 5 min mit 9 μ molar Antimycin inkubiert und danach mit 2 mmolar NADH reduziert .

Spektrum (B) ohne Antimycin. Es ist identisch mit Spektrum (A) in Abb. 11.

9. Extrareduktion von Cytochrom b-566

Die Messung kontinuierlicher Cytochromspektren diente dazu, die Lage der Absorptionsbanden zu ermitteln. Die Höhe der Maxima und damit die Konzentration des reduzierten Cytochroms, das bei entsprechender Wellenlänge absorbiert, lässt sich genauer mit der Zweiwellenlängen - Spektroskopie bestimmen. Dabei werden 2 Lichtstrahlen verschiedener Wellenlänge in eine Proteinsuspension bei 25°C eingestrahlt. Der erste Strahl hat die Messwellenlänge. Der zweite Strahl ist auf einen isosbestischen Punkt eingestellt, dh., dass bei seiner Wellenlänge die Extinktion von oxidierten und reduzierten Probe gleich gross ist.

Die Messung der Extrareduktion soll die Wirkung von Antimycin plus Sauerstoff auf den Redoxzustand des b - Cytochroms, welches bei 561 nm (77°K) absorbiert, verfolgen. Da dieses Cytochrom bei Zimmertemperatur sein Absorptionsmaximum bei 566 nm hat, wird dieser Effekt als Absorptionsdifferenz zwischen 566 nm und dem isosbestischen Punkt bei 573 nm gemessen.

In Abwesenheit von Antimycin ist nach Substratzugabe bei 566 nm bereits eine Reduktion von b - Cytochromen zu beobachten, deren Absorptionsmaxima jedoch nicht bei dieser Wellenlänge liegen. Bei Zugabe steigender Mengen Hemmstoff nimmt die Absorption von 50 % auf 80 % bis 90 % zu. Die Ursache dieser Veränderung ist die Antimycin - induzierte Reduktion des Cytochrom b-566. Der Effekt steigender

Antibiotikum - Konzentrationen auf die Extrareduktion beschreibt eine sigmoidale Kurve. Sein Maximum wird in der Mutante bei 1,5 nMol Antimycin pro mg Protein und beim Wildtyp bei 0,15 nMol Antimycin pro mg Protein erreicht (Abb. 13). Das ist wenig mehr als diejenige Konzentration, welche zur Hemmung der NADH - Oxidase des jeweiligen Stammes führt.

Ubichinon-3, das bei A N T 8 die Hemmung durch Antimycin aufhebt, hat weder beim Wildtyp noch bei der Mutante eine Wirkung auf den durch das Antibiotikum hervorgerufenen Reduktionszustand von Cytochrom b-566. Auch das kürzerkettige Ubichinon-1 beeinflusst nicht die Extrareduktion beim Wildtyp von Sch. pombe. Jedoch bei A N T 8 macht Ubichinon-1 die zusätzliche Reduktion von Cytochrom b-566 rückgängig. Nach Zugabe dieses Chinons fällt die Höhe des Absorptionsmaximum von 80 % bis 90 % kurzfristig auf 0 % ab und steigt dann wieder auf ca. 50 % an (Abb. 14). Um unterscheiden zu können, ob der Substrat- oder der Antimycin - induzierte Anteil dieser Bande verschwindet, wurden nur mit NADH reduzierte mitochondriale Partikel der Mutante ohne Antibiotikum mit Ubichinon-1 versetzt. Dabei bleibt die durch NADH bewirkte Reduktion trotz Zugabe von Ubichinon-1 erhalten. Das bedeutet, dass dieses Chinon in A N T 8 die Reduktion desjenigen b - Cytochroms aufhebt, dessen Reduktion durch Antimycin induziert wird.

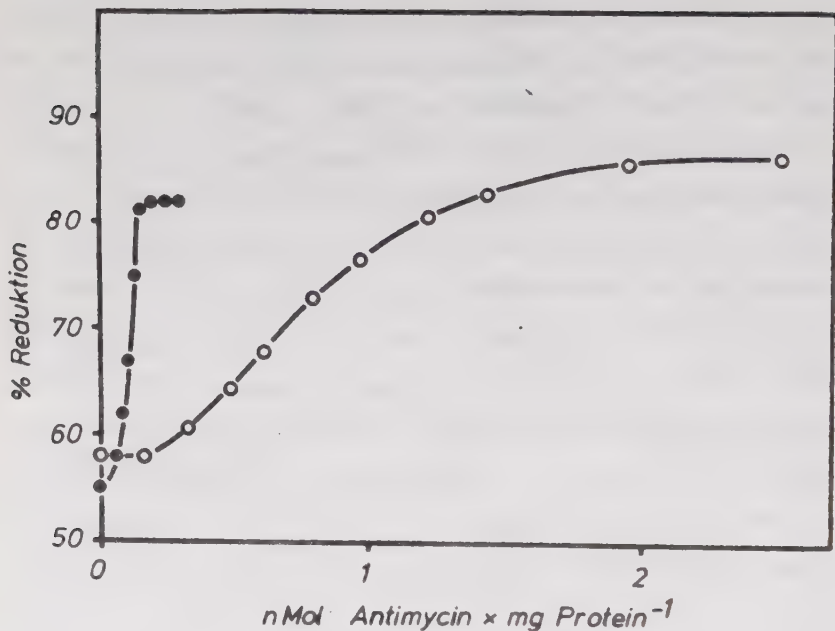


Abb. 13:

Titration der Extrareduktion des Cytochrom b-566 mit Antimycin bei Wildtyp und Mutante. Die Reduktion wurde als Absorptionsdifferenz zwischen 566 nm und 573 nm gemessen. Das mitochondriale Protein wurde mit 2 mmolar NADH + 1 mmolar KCN reduziert. Konzentration des mitochondrialen Proteins: Wildtyp, 3 mg pro 3 ml Testansatz; Mutante, 2,8 mg pro 3 ml Testvolumen. ●, Wildtyp; ○, Mutante A N T 8.

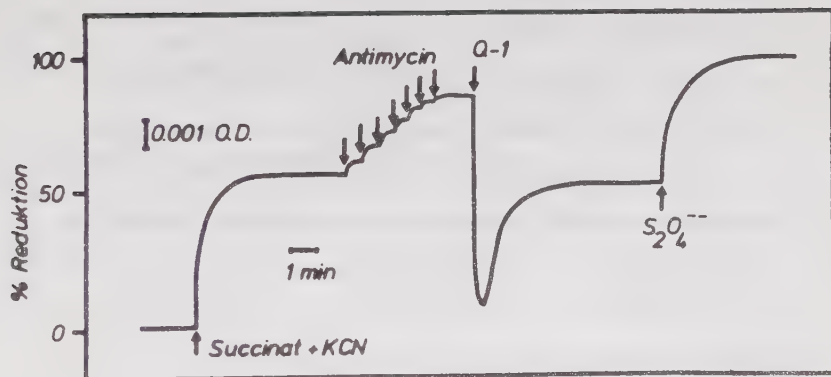


Abb. 14:

Extrareduktion des Cytochrom b-566 bei der Mutante A N T 8.
 Messung und Reduktion wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben.
 Konzentration des mitochondrialen Proteins: 2,8 mg pro 3 ml
 Testvolumen; von Antimycin: maximal 1,85 μ molar; von Ubichinon-1:
 300 μ molar.

IV. DISKUSSION

A. Die Atmungskette des Wildtyps von Sch. pombe

In der Literatur werden 3 Modelle des Elektronentransports vorgeschlagen, die alle der sigmoidalen Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität und des Reduktionsgrades des Cytochrom b-566 von der Antimycin - Konzentration Rechnung tragen (Berden und Slater, 1972; Kröger und Klingenberg, 1973; Wikström und Berden, 1972). Sie wurden als Ergebnis von Versuchen an Rinderherz-mitochondrien aufgestellt. Die im vorstehenden erhobenen Befunde bei Sch. pombe lassen sich jedoch nicht mit den in den Modellen dargelegten Vorstellungen über den Elektronentransport der Atmungskette in Übereinstimmung bringen:

1. Bindung und Hemmwirkung des Antimycin

Das mitochondriale Protein des Wildtyps von Sch. pombe weist 2 hochaffine Bindungsstellen für das Antibiotikum auf, die in etwa gleicher Konzentration vorliegen. Die Wirksamkeit des Antimycin auf die NADH - Oxidase - und die NADH : Cytochrom c - Oxidoreduktase - Aktivität ist unterschiedlich. Zur Hemmung des Teilabschnittes der Atmungskette, der nur Komplex I und III umfasst, ist fast doppelt soviel Antibiotikum nötig wie zur Hemmung des Elektronentransports zur Endoxidase. Der Vergleich der Antimycin - Titer, die zur Hemmung der Enzymaktivitäten

und zur Absättigung der Bindungsstellen eingesetzt werden müssen, macht deutlich, dass a) die Blockierung des Elektronentransports auf Cytochrom c annähernd soviel Antibiotikum erfordert, wie beide Bindungsstellen binden können; b) die Sauerstoffreduktion bereits bei Hinzufügen derjenigen Antibiotikum - Konzentration eingestellt wird, die nur eine Bindungsstelle absättigt.

Bei Rinderherz- und Candida - Mitochondrien wurde weder von unterschiedlicher Wirksamkeit des Antimycin auf die NADH - Oxidase und NADH - Cytochrom c - Oxidoreduktase, noch von 2 Antimycin - Bindungsstellen berichtet.

2. Modell der Atmungskette bei Sch. pombe

Aus dem vorstehenden muss geschlossen werden, dass die festere Bindungsstelle A_1 für die Hemmung des Elektronentransports zum Sauerstoff verantwortlich ist. Die NADH : Cytochrom c - Oxidoreduktase dagegen wird erst durch Absättigung beider Bindungsstellen blockiert. Die Anordnung von A_1 und A_2 in einem linearen Elektronentransportweg kann nicht erklären, dass zur Hemmung eines Teilabschnittes der Atmungskette ungefähr doppelt soviel Antimycin benötigt wird, wie zur Hemmung des Elektronentransports über die gesamte Atmungskette*. Deshalb darf angenommen werden, dass die Elektronen auf einem gegabelten Weg A_1 und A_2 passieren. Es liegt nahe, dass der Zwei - Elektronentransport, von der NADH - Dehydrogenase kommend, sich beim Ubichinon in zwei Ein - Elektronentransport-

* Auf Grundlage dieser Überlegung wird im folgenden von entsprechend gerundeten Zahlenverhältnissen ausgegangen: $A_1:A_2 = 1:1$ (statt 1:0,7), Titer zur Hemmung der NADH - Oxidase und der NADH - Cytochrom c - Oxidoreduktase = 1:2 (statt 1:1,8).

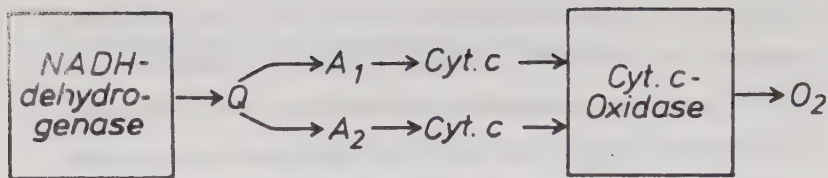


Abb. 15:

Modell einer gespaltenen Elektronentransportkette, in der pro Ast eine Antimycin - Bindungsstelle enthalten ist. Der Zwei - Elektronentransport zweigt sich beim Ubichinon in zwei Ein - Elektronentransportketten auf. Q, natürliches Ubichinon; A_1 , A_2 , Antimycin - Bindungsstellen.

ketten verzweigt, wobei jeder Ast eine Antimycin - Bindungsstelle trägt (Abb. 15). Dabei könnte Ubichinol - Radikal, neben Ubichinol, als zusätzlicher Elektronendonator fungieren, da das Vorhandensein des ersteren in mitochondrialen Partikeln nachgewiesen wurde (Bäckström et al., 1970). Es ist nicht zu erwarten, dass Ubichinol - Radikal so stabil ist, wie in einem der Modelle angenommen wird (Wikström und Berden, 1972), sondern viel eher, dass es in Ubichinol und Ubichinon disproportioniert, falls es nicht verbraucht wird. Auch ist wohl die Reduktion von Ubichinon durch die NADH - Dehydrogenase eine Zwei - Schritt - Reaktion, sodass Ubichinol - Radikal produziert werden könnte, obgleich Ubichinol nur in sehr geringem Masse oxidiert wird. Auf diese Weise wäre zu erklären, dass die beiden Oxidationsschritte von Ubichinol relativ unabhängig voneinander ablaufen können (Abb. 16).

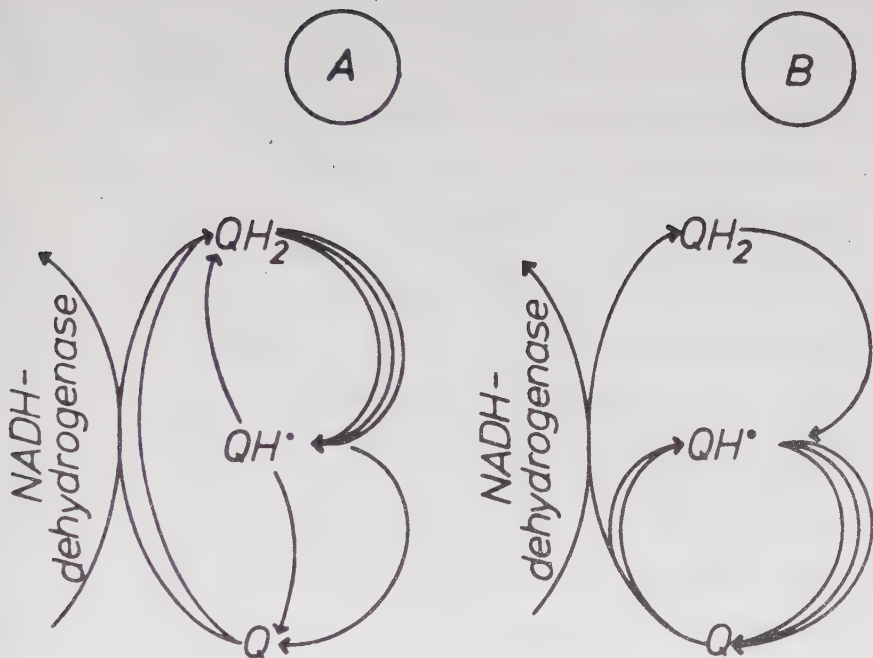


Abb. 16:

Modell der zwei Oxidationsschritte des Ubichinol, die in ihren Geschwindigkeiten voneinander unabhängig sind. Die Zahl der Pfeile steht für die relativen Geschwindigkeiten.

(A) bei hoher Konzentration disproportioniert Ubichinol - Radikal ($QH^\bullet$) zu Ubichinol (QH_2) und Ubichinon (Q).

(B) bei niedriger Konzentration von $QH^\bullet$ und hoher Konzentration von QH_2 wird $QH^\bullet$ von der NADH - Dehydrogenase produziert.

Die Annahme, dass die Elektronentransportkette im bc_1 - Segment verzweigt ist und die Elektronendonator - Aktivitäten beider Wege relativ ungekoppelt sind, ermöglicht eine Interpretation der vielfältigen Formen der Hemmkurven bei unterschiedlichen Substraten. Die NADH : Cytochrom c - Oxidoreduktase - Geschwindigkeit beispielsweise nimmt mit steigender Antimycin - Konzentration nahezu linear ab. Dies würde den Fall widerspiegeln, in dem der Elektronenfluss beider Wege gleich schnell ist. Zugabe von Ubichinon beschleunigt nur den Transport über den A_2 - Ast, wodurch die Hemmkurve sigmoidaler wird. Die Hemmkurve der NADH : Cytochrom c - Oxidoreduktase wäre somit zusammengesetzt: - aus dem Verlauf der Elektronentransportgeschwindigkeit des A_1 - Astes, die mit Absättigung von A_1 - und aus dem Verlauf der Geschwindigkeit über den A_2 - Ast, die durch Absättigung von A_2 mit Antimycin blockiert wird (Abb. 17).

Durch Entfernen des in der Membran gebundenen Cytochrom c wird die NADH - Oxidase - Aktivität stark beeinträchtigt. Auch extern zugegebenes Pferdeherz - Cytochrom c kann die ursprüngliche Aktivität nicht völlig rekonstituieren. Folglich läuft der Elektronentransport des A_1 - Astes wesentlich über Membran - gebundenes Cytochrom c. Da im NADH - Oxidase - Test zumindest der Grossteil der Elektronen über A_1 fließt, ist anzunehmen, dass die Elektronen des A_2 - Astes zwar extern zugegebenes Cytochrom c reduzieren, aber schlecht mit dem in der Membran integrierten äquilibrieren. Dass der A_1 - Zweig

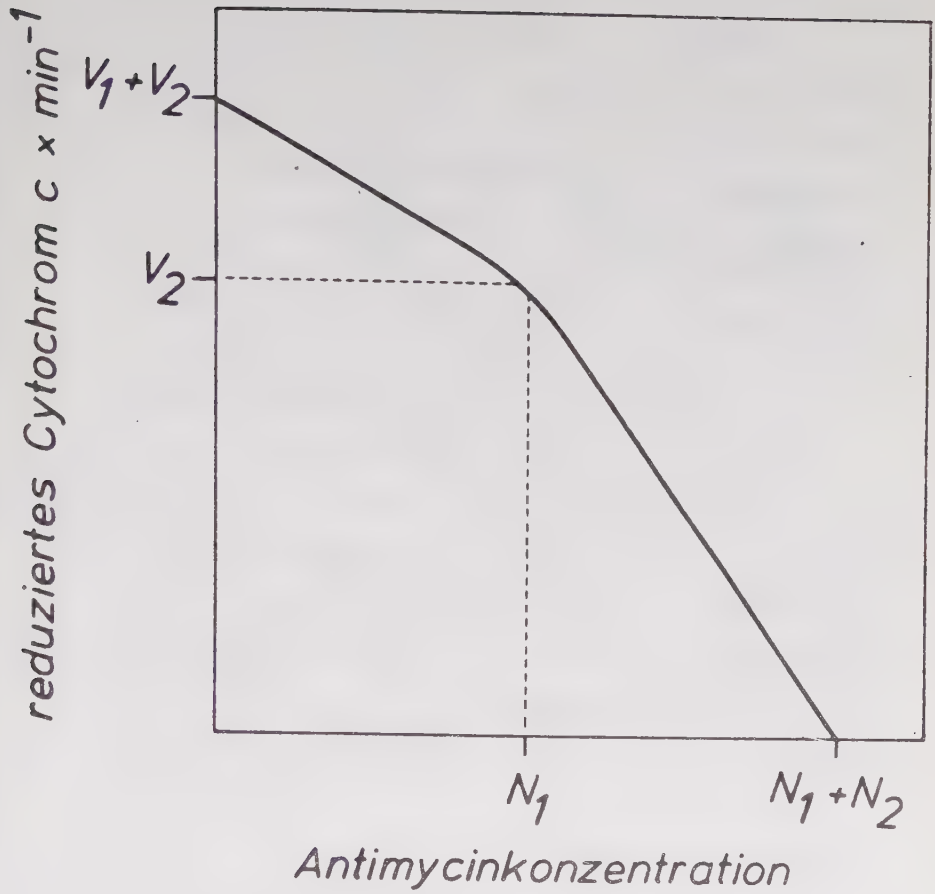
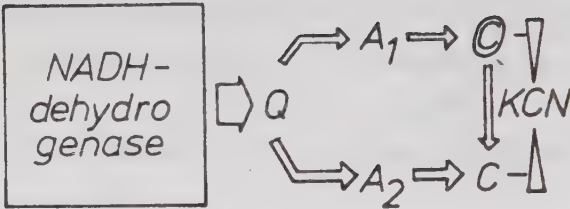


Abb. 17:

Vermutliche Zusammensetzung der Antimycin - Hemmkurven mit Cytochrom c als Elektronenakzeptor. V_1 , V_2 , Geschwindigkeit des Elektronentransports des A_1 - bzw. A_2 -Astes; N_1 , N_2 , Konzentration von A_1 bzw. A_2 .

A



B

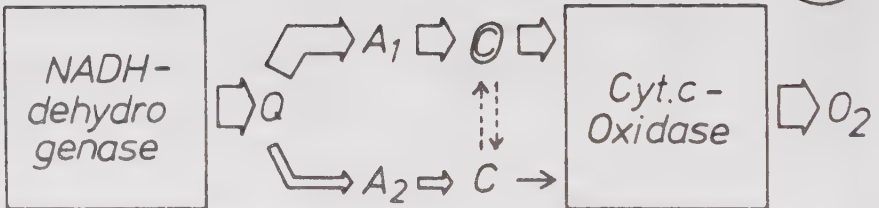


Abb. 18:

Modell der Verteilung der Elektronentransport - Geschwindigkeiten über die 2 Äste der Atmungskette im NADH : Cytochrom c - Oxidoreduktase - (A) und NADH - Oxidase - Test (B)*. C, zugegebenes Pferdeherz - Cytochrom c; ©, in der Membran integriertes Cytochrom c; Q, natürliches Ubichinol/Ubichinol - Radikal/Ubichinon, siehe Abb.16. Die Dicke der Pfeile stellt die relative Geschwindigkeit dar. Zur relativen Unabhängigkeit der Geschwindigkeit beider Wege, siehe S.50.

* In B ist der Elektronenfluss zwischen © und C in beiden Richtungen nur angedeutet da das Ausmass dieser Reaktionen nicht untersucht wurde.

dennoch zur Reduktion des zugegebenen Cytochrom c beitragen kann, - wie in der NADH : Cytochrom c - Oxidoreduktase , - ermöglicht KCN, das diesem Test beigelegt wird. Durch Blockieren des Komplex IV äquilibrieren gebundenes und zugefügtes Cytochrom c. Die Beteiligung der beiden Elektronentransportwege am Elektronenfluss zum Cytochrom c bzw. Sauerstoff ist in Abb. 18 dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass die NADH : Cytochrom c - Oxidoreduktase wegen der geschwindigkeits-limitierenden Reduktion von Pferdeherz - Cytochrom c eine im Vergleich zur NADH - Oxidase geringere Aktivität besitzt. Versuche, in denen Pferdeherz - Cytochrom c durch Candida - Cytochrom c ersetzt wurde, bestätigen diese Interpretation.

Wenn der Hauptelektronentransport der NADH - Oxidase über A_1 läuft, wäre zu erwarten, dass die Hemmkurve mit Antimycin linear ist. Ihre Sigmoidalität wurde für Rinderherzmitochondrien durch einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt vor Komplex III erklärt (Kröger und Klingenberg, 1973). Diese Deutung scheint für jenen Organismus zuzutreffen, ist doch die NADH : Cytochrom c - Oxidoreduktase in Gegenwart von Deoxicholat, das anscheinend den Aktivitäts - limitierenden Schritt abbaut, 6 mal schneller als die NADH - Oxidase. Bei Hefe jedoch fließen die Elektronen immer schneller zum Sauerstoff als zum Cytochrom c. Die Sigmoidalität der Hemmkurve der NADH - Oxidase durch Antimycin muss folglich bei Sch. pombe auf eine andere Weise zustande kommen:

Das Substrat des A_1 - Astes^{*} wird rasch oxidiert, wodurch wesentlich mehr Substrat für den A_2 - Ast als unter den Bedingungen wie im NADH + Cytochrom c - Oxidoreduktase - Test produziert wird. Die Elektronen, die über A_2 fließen, werden im wesentlichen zugegebenes Cytochrom c reduzieren, da ihr Äquilibrieren mit dem gebundenen Cytochrom c und ihr Abfließen auf die Endoxidase erschwert sind. Der Elektronentransport über den A_2 - Weg zum Sauerstoff wird somit von der Konzentration des reduzierten Pferdeherz - Cytochrom c abhängen. Ihre Festlegung erfolgt durch die Geschwindigkeit der Reaktion des A_1 - Astes, da er das Substrat für die zweite Transportkette liefert. Deshalb wird bei Bindung von Antimycin an A_1 auch die Aktivität des A_2 - Astes beeinträchtigt. Dafür spricht ein Versuch der Fliessgleichgewichts - Oxidation von NADH : Der Reduktionsgrad von Pferdeherz-Cytochrom c fällt bei Hemmung durch Antimycin mit der Aktivität der NADH - Oxidase ab. Die Restkonzentration von reduziertem zugegebenem Cytochrom c (2 %) bei Totalhemmung der NADH - Oxidase scheint zu klein zu sein, um einen mit der polarographischen Methode messbaren Elektronenfluss über A_2 zu induzieren.

Damit wäre die Hemmkurve der NADH - Oxidase ebenfalls zusammengesetzt, aber auf eine andere Weise als die NADH : Cytochrom c - Oxidoreduktase: - aus der streng sigmoidalen Aktivitätskurve des Elektronentransports über A_2 - und aus der wesentlich steileren der Transportkette über A_1 . Die Form der Abhängigkeit der Elektronenfluss - Geschwindigkeit des A_1 -

* Es bleibt offen, ob Ubichinol oder das Radikal Substrat des A_1 - Astes ist.

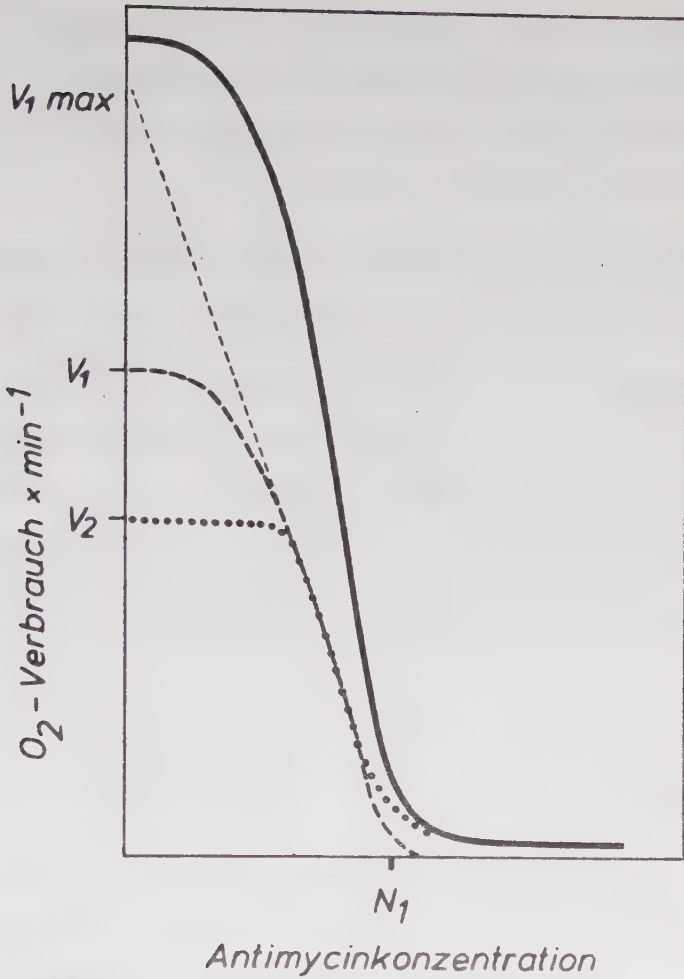


Abb. 19:

Vermutliche Zusammensetzung der Antimycin - Hemmkurven mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor. V_1 , V_2 , N_1 , siehe Legende zu Abb. 19; $V_1 \text{ max.}$, maximale Transport - Geschwindigkeit des A_1 - Astes bei Substratsättigung.

Zweiges kann linear, aber auch, im Falle von Substratmangel, analog zu der Theorie von Kröger und Klingenberg (1973), sigmoidal sein. Letzteres würde die Ausprägung der Schulter der Antimycin - Effektkurve verstärken (Abb. 19).

Diese Erklärung der sigmoidalen Form der Antimycin - Hemmkurve der NADH - Oxidase trägt der hohen Aktivität dieses Atmungsketten - Abschnittes Rechnung, denn es wird postuliert, dass die Aktivität von der Transportgeschwindigkeit des A_1 - und A_2 -Astes und nicht von der vergleichsweise niedrigen Elektronen-Übertragerrate des Pferdeherz - Cytochrom c abhängt. Dass die NADH - Oxidase bereits bei Bindung von Antimycin an A_1 blockiert wird, wurde im vorstehenden als Kopplung der Geschwindigkeiten beider Wege aufgrund des hohen Substratumsatzes gedeutet.

B. Ursache der Antimycin - Resistenz

Die eingehende Untersuchung des mitochondrialen Elektronentransports beim Hefewildtyp war die Voraussetzung dafür, die veränderten Funktionen der Antimycin - resistenten Mutanten zu erfassen. Mit jeder der angewandten biochemischen Charakterisierungsmethoden bezüglich des bc_1 - Segments der Atmungskette liessen sich bei A N T 8 Unterschiede gegenüber dem Ausgangsstamm finden:

Wildtyp und Mutante unterscheiden sich in 1) dem Ausmass der Hemmwirkung durch eine gegebene Antimycin - Konzentration, 2) der Bindung des Hemmstoffes, 3) der Absorptionsbande eines b - Cytochroms, 4) dem Grad der Extrareduktion des Cytochrom b-566 bei einer bestimmten Konzentration des Antibiotikums und 5) der Wechselwirkung zwischen Antimycin und Ubichinon. Aus diesen Befunden soll nun versucht werden, auf die Art der biochemischen Veränderungen der Atmungskette zu schliessen, welche die Resistenz verursachen.

1. Bindung und Hemmwirkung des Antimycin bei A N T 8

Aus dem Vergleich der Konzentrationsabhängigkeit der Bindung und des Hemmeffekts eines Inhibitors unter identischen Bedingungen können Erkenntnisse über den Mechanismus der Hemmung gewonnen werden. Die Schwierigkeit dieses Verfahrens ergibt sich dadurch, dass sowohl beim Hefewildtyp, als auch bei der Antimycin - resistenten Mutante 3 Bindungsstellen unterschiedlicher Bindungsfestigkeit für Antimycin bestehen.

Zunächst ist es wichtig festzustellen, ob die Bindungsstellen jeweils verschiedene Funktionen besitzen oder ob es sich um identische Bindungsstellen handelt, deren unterschiedliche Dissoziationskonstanten Produkt einer stufenweisen, allosterischen Umwandlung sind. Für den Wildtyp wurde die Frage dahingehend gelöst, dass die beiden spezifischen Bindungsstellen getrennte Hemmwirkungen in 2 verschiedenen Elektronentransportketten des bc_1 - Segment ausüben. Aufgrund der ähnlichen Form der Antimycin - Hemmkurven der NADH - und Succinat - Oxidase bei Wildtyp und Mutante, sowie der für beide Stämme annähernd gleichen Konzentrationen für die beiden spezifischen Bindungsstellen (bezogen auf die Masse mitochondrialen Proteins) sind deren Elektronentransport - Systeme offenbar ähnlich angelegt.

Gravierende Unterschiede zwischen A N T 8 und Wildtyp lassen sich bezüglich der Konzentrationsabhängigkeit der Hemmwirkung des Antimycin feststellen. Bei allen 6 bisher charakterisierten Mutanten ist die Resistenz nicht absolut. Für eine 90 % ige Blockierung der Atmungskette wird etwa das 10-fache der für den Wildtyp notwendigen Hemmstoffmenge benötigt. Dieser Sachverhalt ist insofern unerwartet, als aus den Bindungsstudien bei der Mutante Dissoziationskonstanten im Bereich von 10^{-10} molar gefunden wurden. Aus dieser ausserordentlich festen Bindung des Antibiotikum an die mitochondrialen Partikel wäre kaum ein Unterschied zwischen den Hemmkurven des Wildtyps und der Mutante abzuleiten. Dieses

Auseinanderfallen von Hemmwirkung und Bindung kann zwei Gründe haben. Einmal kann eine allosterische Interaktion dazu führen, dass sich die beobachtete Hemmwirkung unproportional zur Menge des gebundenen Antimycin verhält (Berden und Slater, 1972). Eine andere Erklärungsmöglichkeit dieser Diskrepanz besteht darin, dass die Bedingungen, unter denen die Hemmkurven aufgenommen wurden, sich von denen der Bindungsstudien unterscheiden. Im vorliegenden Fall liegt die Differenz darin, dass der Bindungstest an oxidierten mitochondrialen Partikeln durchgeführt wurde, also bei fehlendem Elektronenfluss. Die Bindung des Antimycin, sowie die darauf folgenden Operationen bis zur Messung nehmen mindestens 30 min in Anspruch. Aus diesem Grund sind mit dem Enzymtest vergleichbare Bedingungen, wie Fliessgleichgewichts - Reduktion der Atmungskette, entsprechende Sauerstoff- und Substratsättigung, in diesem Zeitraum technisch nicht zu verwirklichen. Bekannt ist von Antimycin - Bindungsversuchen an mitochondrialen Partikeln, die mit Substrat + KCN reduziert wurden, -also auch keinen Elektronentransport aufweisen-, dass die stärkste Bindungsstelle eine 10^3 mal grössere Dissoziationskonstante besitzt als im oxidierten Stadium (Berden und Slater, 1972). Eine früher behauptete allosterische Interaktion bei reduzierten Partikeln wurde nicht mehr bestätigt (Slater, persönliche Mitteilung).

Damit ist das Auseinanderfallen von Hemmwirkung und Bindung am einfachsten erklärbar durch eine Komponente der Atmungskette, die im reduzierten Zustand die Antimycin - Bindung

abschwächt. In der Mutante müssen allerdings beide Antimycin - Bindungsstellen von diesem Mechanismus betroffen sein. Dies lässt sich aus dem Vergleich von NADH - Oxidase und NADH : Cytochrom c - Oxidoreduktase ablesen:

Das Verhältnis der Antimycin - Konzentrationen, welche die NADH - Oxidase und die NADH : Cytochrom c - Oxidoreduktase blockieren, ist im Wildtyp ungefähr 1 : 2 . Die Hemmkonzentrationen entsprechen den Konzentrationen der 2 Bindungsstellen. Die stärkere Bindungsstelle des Wildtyps (A_1) kontrolliert, wie schon erwähnt, den Elektronenfluss auf Sauerstoff. A_1 und die schwächere Bindungsstelle (A_2) zusammen, liegen auf dem Elektronentransportweg zu extern zugegebenem Cytochrom c. Da A_1 und A_2 etwa äquimolar im mitochondrialen Protein vorliegen, ergibt sich die genannte Proportion $A_1 : (A_1 + A_2) = 1 : 2$. In A N T. 8 ist das Verhältnis der Hemmkonzentrationen des Antibiotikum für NADH - Oxidase und NADH : Cytochrom c - Oxidoreduktase etwa 1 : 3 . Nun benötigt die NADH - Oxidase ca. 6 mal, die NADH : Cytochrom c - Oxidoreduktase ca. 10 mal soviel Hemmstoff wie der Wildtyp bei 80 % iger Hemmung. Der Mechanismus, der den Antimycin - Effekt abschwächt, ist also für beide Elektronentransportwege etwa in derselben Grössenordnung wirksam.

Auf den Grund dieser Erscheinung soll bei der Diskussion über die Aufhebung der Antibiotikumwirkung durch Ubichinon noch ausführlich eingegangen werden.

2. Vergleich von Extrareduktion und Hemmung durch Antimycin

Die Extrareduktion des Cytochrom b-566 wie die Hemmung der NADH - Oxidase zeigen die gleiche Abhängigkeit von der Antibiotikumkonzentration. Bei der Mutante sind die vergleichbaren Kurven schwach, beim Wildtyp von *Sch. pombe* stark sigmoidal. Aus dieser Ähnlichkeit lässt sich der Schluss ziehen, dass die Bedingungen, unter denen die Kurven aufgenommen wurden, bezüglich der Effektivität der Antimycin - Wirkung identisch sind. Die Extrareduktion wurde an Substrat - reduzierten Partikeln in Gegenwart von KCN gemessen und beim Oxidase - Test liegt das Protein teilweise reduziert vor. Damit bestätigt sich die vorstehend postulierte Abschwächung der Antibiotikums- wirkung durch die reduzierte Form einer oder mehrerer Atmungskettenkomponenten. Welche Komponente(n) dafür verantwortlich sein könnte(n), wird im folgenden ausgeführt.

3. Die Aufhebung von Extrareduktion und Antimycin - Hemmung durch Ubichinon

Bei der Suche nach dem Grund der zunächst unerwartet hohen in vitro - Resistenz von A N T 8 gegen Antimycin fiel zunächst die Abschwächung der Hemmung der Atmungsketten- aktivität durch extern zugesetztes Ubichinon-3 auf. Dieses steigert bei Wildtyp und Mutante die Elektronentransport - Aktivität bis zu 60 %, macht aber nur bei A N T 8 die Antimycin - Hemmung rückgängig. Bezüglich der Extrareduktion des Cytochrom b-566 wurde dieser Effekt von Ubichinon-3 allerdings weder bei Wildtyp noch Mutante gefunden. Hier

erwies sich das weniger lipophile Ubichinon-1, das in höherer Konzentration als Ubichinon-3 im Testgemisch löslich ist, bei der Mutante als wirksam. Beim Wildtyp hat Ubichinon-1 keinen Effekt. Nach Einrühren dieses Chinons (+ Sauerstoff) tritt bei A N T 8 eine kurzfristige Oxidation aller b-Cytochrome, die bei 566 nm absorbieren, auf. Dies wird offensichtlich durch den zeitlich beschränkten aeroben Zustand der Proteinsuspension hervorgerufen. Das sich anschliessend einstellende Reduktionsniveau wird nur von dem Substrat - reduzierbaren Anteil der b-Cytochrome, die bei 566 nm absorbieren, verursacht.

Dass Antimycin und Ubichinon als Antagonisten auftreten, beschrieben bereits Takemori und King (1964,a),b)). Slater (1973) griff dies später nur als Kuriosum wieder auf. Diese Wechselwirkung wurde an einer spezifischen Präparation von Atmungskettenenzymen beobachtet und als Konkurrenz lipophiler Substanzen gedeutet. Im vorliegenden Fall lässt sich diese Interpretation leicht als unrichtig nachweisen. Einmal zeigen lipophile Substanzen, wie z.B. alle Detergentien der Tween - Reihe, sowie Lubrol - WX, diese Wirkung in weitaus geringerem Masse (Lang et al., 1974). Zum anderen wäre so nicht zu erklären, warum die Aufhebung der Extrareduktion gerade mit dem weniger lipophilen Ubichinon-1 und nicht mit Ubichinon-3 gelingt, Ubichinon-3 aber die Hemmung aufzuheben vermag. Es liegt daher nahe anzunehmen, dass die reduzierte Form des chinoiden Ringsystems und nicht die lipophile Seitenkette des Ubichinon die Ursache für die Aufhebung der Antimycin -

Wirkung ist. Beim Wildtyp wird diese Erscheinung vermutlich deshalb nicht beobachtet, weil der Hemmstoff so fest bindet, dass selbst die Menge Ubichinon-1, die in dem wässrigen Testansatz gelöst werden kann, nicht ausreicht, um diese Bindung rückgängig zu machen. Dass Ubichinon auch im Wildtyp von Sch. pombe einen Einfluss auf die Antimycin - Bindung ausübt, legen Versuche an Rinderherzmitochondrien nahe. Nach Extraktion des endogenen Ubichinon aus den Atmungsketten - Partikeln zeigt sich eine schnellere Bindung des Antibiotikum (Nelson et al., 1972).

Das Angreifen verschiedener Chinonderivate im bc_1 - Segment ist schon seit geraumer Zeit bekannt (Porter und Folkers, 1974). Diese Stoffe treten in Konkurrenz zum Ubichinon der Atmungskette und zeigen entweder Hemmung oder auch Stimulation des Elektronentransports. Die strukturelle Ähnlichkeit solcher Inhibitoren (Chinone, Chinolinchinone, Naphthochinone und Chinolin-N-Oxide) mit dem Ubichinon ist kaum von der Hand zu weisen. Die Frage, ob die genannten Hemmstoffe und das Antimycin an identischen Stellen angreifen und ob der Antagonismus zum Ubichinon auf eben diesem Mechanismus beruht, ist noch zu untersuchen. Für Hydroxy-Chinolin-N-Oxid gibt es bereits Befunde, dass es, -obwohl es ganz ähnliche Effektkurven wie Antimycin erzeugt und seine Wirkung auch durch Ubichinon-3 aufgehoben werden kann (Burger und Lang, 1975 a)), - an einem anderen Ort der Atmungskette hemmt als Antimycin: A N T 8 zeigt nämlich keine in vitro - Kreuzresistenz für die beiden

Inhibitoren (Burger und Lang, 1975 b)).

Die Annahme einer allosterischen Umwandlung im bc_1 - Segment der Mutante A N T 8 wird durch den Vorgang der Substrat - induzierten Verstärkung der Antimycin - Hemmung gestützt (Lang und Burger, 1975 b)): Bei Zugabe von Succinat zu einem partiell gehemmten NADH - Oxidase - Test wird ein bis um 100 % verstärkter Hemmeffekt beobachtet. Das zusätzliche Substrat könnte entsprechend dem Modell von Monod et al. (1965) eine Aktivatorfunktion ausüben, indem es selbst, -oder eine von ihm reduzierte Komponente, - durch Bindung an das bc_1 - Segment eine Konformationsänderung hervorruft. In dem neuen Zustand würde das Antibiotikum fester gebunden und damit der Hemmeffekt verstärkt werden. Die Komponente, die bei diesem Vorgang zusätzlich reduziert wird, konnte als ein b-Cytochrom identifiziert werden, das im Hauptelektronenfluss in der Nähe der Antimycin - Bindungsstelle A_1 angeordnet ist.

4. Spektrale Veränderung der b - Cytochrome von A N T 8

Das durch Substrat in Gegenwart von Antimycin und Sauerstoff zusätzlich reduzierbare Cytochrom b-566, dessen Redoxverhalten bei A N T 8 durch Ubichinon-1 beeinflusst wird, zeigt kein verändertes Differenzspektrum bei 77°K. Jedoch die Bande des Substrat - reduzierbaren b - Cytochroms, das bei 560,2 nm absorbiert, ist in der Mutante zum Rotwelligen (561 nm) verschoben. Dies kann 2 Ursachen haben: Die Veränderung einer das b - Cytochrom umgebenden Komponente, oder der Primärstruktur

des Proteinrests des Cytochroms selbst. Wenn sich die Mutante durch einen Aminosäureaustausch im b - Cytochrom auszeichnete, so stünde dies in Einklang mit Proteinsynthese - Untersuchungen bei Neurospora (Weiss et al., 1971; Weiss und Ziganke, 1974). Nach diesen Ergebnissen findet die Synthese von b-Typ Cytochrom im Mitochondrium statt; alle anderen Komponenten des bc_1 - Segments werden von den Ribosomen des Cytoplasma synthetisiert. Zwar ist über den Ort der Codierung der b- Cytochrome noch nichts bekannt, doch deutet die extrakaryotische, sehr wahrscheinlich mitochondriale Vererbung der Antimycin-Resistenz darauf hin, dass sowohl diese Mutation der spektralen Verschiebung des Substrat-reduzierbaren b-Cytochroms zugrunde liegt, als auch, dass sich dieses Cytochrom in unmittelbarer Nachbarschaft der Antibiotikum-Bindungsstelle befindet, oder mit dieser identisch ist.

Auf dem jetzigen Stand der Untersuchungen lässt sich die Ursache der in vitro - Resistenz der Mutante A N T 8 gegen Antimycin folgendermassen erklären: Wie sich aus den Studien mit synthetischem Ubichinon schliessen lässt, wird die relativ feste Bindung des Antibiotikum an die mitochondrialen Partikel vermutlich durch reduzierte Formen des endogenen Ubichinon abgeschwächt. Diese Wechselwirkung, die auch, wenngleich in geringerem Masse, beim Wildtyp stattfindet, wird offensichtlich durch die Veränderung der Antimycin - Bindungsstellen verstärkt. Das durch Mutation veränderte, Substrat - reduzierbare b - Cytochrom von A N T 8 ist in unmittelbarer Nachbarschaft der Antimycin - Bindungsstellen oder identisch mit diesen. Codierung und Synthese dieses b - Cytochroms ist vermutlich mitochondrial.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Durch Bindungsstudien werden 2 unterschiedliche spezifische Bindungsstellen der mitochondrialen Partikel des Wildtyps von Sch. pombe für Antimycin nachgewiesen.

2. Diesen Bindungsstellen können verschiedene Funktionen im Elektronentransport der Atmungskette zugeordnet werden:

- Das an die stärkere Bindungsstelle gebundene Antibiotikum hemmt die NADH - Oxidase;
- beide Bindungsstellen kontrollieren den Elektronentransport der NADH : Cytochrom c - Oxidoreduktase.

3. Das hier vorgeschlagene Modell der Atmungskette mit gespaltenem Elektronentransportweg durch das bc_1 - Segment trägt diesen Ergebnissen Rechnung.

4. Nach Induktion mit Nitrosoguanidin wurden Mutanten von Sch. pombe isoliert, die genetisch stabil und in vitro teilresistent gegen Antimycin sind.

5. Auch bei der hier beschriebenen Mutante A N T 8 können 2 spezifische Bindungsstellen für Antimycin unterschieden werden, deren Dissoziationskonstanten im Bereich der schwächeren Bindungsstelle des Wildtyps liegen.

6. Verglichen mit dem Wildtyp benötigt A N T 8 ca. 1000 mal mehr Antimycin zur Verminderung der Teilungsrates auf 25 % und 6 - 10 mal mehr Antimycin zur 80 % igen Hemmung der NADH - Oxidase und NADH : Cytochrom c - Oxidoreduktase und zur 80 % igen Ausprägung der Extrareduktion des Cytochrom b-566.

7. Bei der Mutante lässt sich die Hemmung des Elektronentransports durch Ubichinon-3, die Extrareduktion des Cytochrom b-566 jedoch nur durch Ubichinon-1 aufheben.

8. Im Tieftemperaturspektrum von A N T 8 ist eine b - Cytochrom - Bande um ca. 0,8 nm von 560,2 nm nach 561 nm verschoben.

9. Es wird diskutiert, dass das in der Mutante spektral veränderte b - Cytochrom die Resistenz verursacht, - indem es die Wechselwirkung zwischen Antimycin und endogenem Ubichinon an der Antimycin - Bindungsstelle beeinflusst - , und im Mitochondrium synthetisiert und codiert wird.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Avner, P.R. und Griffiths, D.E. (1970)

"Oligomycin resistant mutants in yeast."

FEBS Letters 10, 202 - 207

Bäckström, D., Norling, B., Ehrenberg, A. und Ernster, L. (1970)

"Electron spin resonance measurements on ubiquinone-depleted and ubiquinone-replenished submitochondrial particles."

Biochim. Biophys. Acta 197, 108 - 111

Beck, J.C., Parker, J.H., Balcavage, W.X. und Mattoon, J.R. (1971)

"Mendelian genes affecting development and function of yeast mitochondria."

In: Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplasts. Boardman, Linnane und Smilli, eds., North-Holland Pub. Comp., Amsterdam - London, 194 - 204

Berden, J.A. und Slater, E.C. (1970)

"The reaction of antimycin with a cytochrome b preparation active in reconstitution of the respiratory chain."

Biochim. Biophys. Acta 216, 237 - 249

Berden, J.A. und Slater, E.C. (1972)

"The allosteric binding of antimycin to cytochrome b in the mitochondrial membrane."

Biochim. Biophys. Acta 256, 199 - 215

Bryla, K., Kaniuga, Z. und Slater, E.C. (1969)

"Studies on the mechanism of inhibition of the mitochondrial electron transport by antimycin".

Biochim. Biophys. Acta 189, 317 - 326

Burger, G. und Lang, B. (1975) a)

"The inhibitory effect of antimycin in an antimycin resistant mutant of *Schizosaccharomyces pombe*."

Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 224

Burger, G. und Lang, B. (1975) b)

"The effect of HQNO in the wildtype and in an antimycin resistant mutant of *Schizosaccharomyces pombe*."

FEBS - Kongress, Abstract Nr.1228

Butow, R.A. und Zeydel, M. (1968)

"The isolation of an antimycin resistant mutant of *Torulopsis utilis*."

J. Biol. Chem. 243, 2545 - 2549

Chance, B. (1958)

"The kinetics and inhibition of cytochrome components of the succinic oxidase system,"

J. Biol. Chem. 233, 1223 - 1229

Fletcher, J.E. und Spector, A.A. (1970)

"Analysis of macromolecule - ligand binding by determination of stepwise equilibrium constants."

Biochemistry 9, 4580 - 4587

Grimmelikhuijzen, C.J.P. und Slater, E.C. (1973)

"Antimycin insensitive mutants of *Candida utilis*.
I. Isolation and characterization of mutant 28."

Biochim. Biophys. Acta 305, 67 - 79

Grimmelikhuijzen, C.J.P., Marres, C.A.M. und Slater, E.C. (1975)

"Antimycin insensitive mutants of *Candida utilis*.
II. The effect of antimycin on cytochrome b."

Biochim. Biophys. Acta 376, 533 - 549

Klotz, I.M. (1974)

"Protein interactions with small molecules."

Accounts of Chemical Research 7, 162 - 168

Kröger, A. und Klingenberg, M. (1973)

"Further evidence for the pool function of ubiquinone as
derived from the inhibition of the electron transport
by antimycin."

Eur. J. Biochem. 39, 313 - 323

Lang, B., Burger, G. und Bandlow, W. (1974)

"Activity of reduced ubiquinone : cytochrome c oxidoreduc-
tase with various ubiquinol - isoprenologues as substrate
and corresponding inhibitory effect of antimycin in yeast."

Biochim. Biophys. Acta 368, 71 - 85

Lang, B. und Burger, G. (1975) b)

"Inhibition of NADH oxidase by succinate in an antimycin
resistant mutant of *Schizosaccharomyces pombe*."

FEBS - Kongress, Abstract Nr. 1215

Linnane, W., Lamb, A.J., Christodoulou, C. und Lukins, H.B. (1968)

"The biogenesis of mitochondria. VI. Biochemical basis of resistance of *Saccharomyces cerevisiae* toward antibiotics which specifically inhibit mitochondrial protein synthesis."

Proc. Nat. Acad. Sci. 59, 1288 - 1293

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L.A. und Randall, R.J. (1951)

"Protein measurement with phenol reagent."

J. Biol. Chem. 209, 23 - 29

Monod, J., Wyman, J. und Changeux, J. (1965)

"On the nature of allosteric transitions: A plausible model."

J. Mol. Biol. 12, 88 - 118

Nelson, B.D., Norling, B., Persson, B. und Ernster, L. (1972)

"Influence of ubiquinone on the rate of antimycin binding to submitochondrial particles."

Biochim. Biophys. Acta 267, 205 - 210

Norling, B., Nelson, B.D., Nordenbrand, K. und Ernster, L. (1972)

"Evidence for the occurrence in submitochondrial particles of a dual respiratory chain containing different forms of cytochrome b."

Biochim. Biophys. Acta, 275, 18 - 32

Porter, T.H. und Folkers, K. (1974)

"Antimetaboliten des Coenzym Q. Möglichkeiten ihrer Anwendung als Antimalaria - Mittel."

Angew. Chem. 17, 635 - 645

Rosenthal, H.A. (1967)

"A graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system."

Anal. Biochemistry 20, 525 - 532

Scatchard, G. (1949)

"The attraction of proteins for small molecules and ions."

Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660 - 672

Slater, E.C. (1973)

"The mechanism of action of the respiratory inhibitor antimycin."

Biochim. Biophys. Acta 301, 129 - 153

Takemori, S. und King, T. (1964) a)

"Coenzyme Q : Reversal of inhibition of succinate : cytochrome c reductase by lipophilic compounds".

Science 144, 852 - 853

Takemori, S. und King, T. (1964) b)

"Reconstitution of respiratory chain enzyme systems."

J. Biol. Chem. 239, 3546 - 3558; 3559 - 3569

Weiss, H. Sebald, W. und Bücher, T. (1971)

"Cycloheximide resistant incorporation of amino acids into a polypeptide of cytochrome oxidase of *Neurospora crassa*."

Eur. J. Biochem. 22, 19 - 26

Weiss, H. und Ziganke, B. (1974)

"Cytochrome b in *Neurospora crassa* mitochondria. Site of translation of the heme protein."

Eur. J. Biochem. 41, 63 - 71

Wikström, M.K.F. und Berden, J. (1972)

"Oxidoreduction of cytochrome b in the presence of antimycin."

Biochim. Biophys. Acta 283, 403 - 420

Wolf, K., Sebald-Althaus, M., Schweyen, R. und Kaudewitz, F. (1971)

"Respiratory deficient mutants of *Schizosaccharomyces pombe*."

Molec. Gen. Genet. 110, 101 - 109

Wolf, K. (1973)

"Induktion, selektive Anreicherung, genetische und biochemische Charakterisierung atmungsdefekter Mutanten der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe*. L."

Dissertationsschrift der LMU - München, biol. Fakultät.

Wolf, K., Burger, G., Lang, B. und Kaudewitz, F. (1975) a)

"Extrakaryotic inheritance in *Schizosaccharomyces pombe*.
I. Evidence for an extrakaryotic mutation conferring resistance to antimycin."

in Vorbereitung

Wolf, K., Lang, B., Burger, G. und Kaudewitz, F. (1975) b)

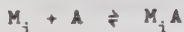
"Extrakaryotic inheritance in *Schizosaccharomyces pombe*.
II. Evidence for extrakaryotic inheritance of respiratory deficiency."

in Vorbereitung

VII. ANHANG

1. Scatchard - Bindungsmodell

Das Scatchard - Bindungsmodell geht von der Betrachtung individueller, unabhängiger Bindungsorte M_i für den Liganden A am Makromolekül aus. Die Reaktionsformel für den Ort i ist



und die Gleichgewichtskonstante ist

$$K_i = \frac{M_i A}{M_i \times A} \quad .$$

Diese Gleichung lässt sich umformen, sodass

$$M_i A = v_i = \frac{K_i \times A}{1 + K_i \times A} \quad .$$

v_i , die Konzentration des an M_i gebundenen Liganden, ist ausgedrückt als eine Funktion der Konzentration des freien Liganden.

N_j Orte mit gleicher K_i können zu m Gruppen zusammengefasst werden. Die Reaktionsformel für die Gruppe j lautet dann:



(M_j wird in der vorliegenden Arbeit als Bindungsstelle bezeichnet.)

Durch Umformung der Gleichgewichtskonstanten

$$K_j = \frac{N_j \times M_j A}{(N_j)^2 \times M_j \times A}$$

wird die Konzentration des an M_j gebundenen Liganden als Funktion der Konzentration des freien Liganden erhalten:

$$v_j = N_j \times \frac{K_j \times A}{1 + K_j \times A} .$$

Dann ist die gesamte Konzentration des gebundenen Liganden

$$\sum_{j=1}^m v_j = \sum_{j=1}^m N_j \times \frac{K_j \times A}{1 + K_j \times A} .$$

2. Stepwise - equilibrium - Bindungsmodell

Das stepwise - equilibrium - Bindungsmodell ist zur Darstellung kooperativer Bindung geeignet und enthält das Scatchard - Modell als Sonderfall. Wie sich aus den Reaktionsgleichungen ergibt, haben die stepwise - Konstanten k und die Scatchard - Konstanten K unterschiedliche Bedeutung. Letztere können für den Fall unabhängiger individueller Bindungsstellen aus den stepwise - equilibrium - Konstanten umgerechnet werden. Das stepwise - equilibrium - Bindungsmodell betrachtet die mit $i = 1, 2, \dots, n$ Liganden A beladenen Makromolekül - Ligand - Komplexe MA_i (stöchiometrische Spezies).

Die Bildungsreaktion der Spezies i ist:



Die Gleichgewichtskonstante ist

$$k_i = \frac{MA_i}{MA_{i-1} \times A} .$$

Die Konzentration der Komplexspezies i (mit i Liganden) ist

$$MA_i = k_1 \times k_2 \times \dots \times k_i \times M \times A^i$$

und die Konzentration des an die Species i gebundenen Liganden

$$v_i = i \times MA_i.$$

Somit ergibt sich für die gesamte Konzentration an gebundenem Liganden als Funktion der Konzentration des freien Liganden

$$\sum_{i=1}^n v_i = \sum_{i=1}^n \frac{\prod_{i=1}^n (i \times k_i) \times A^i}{1 + \prod_{i=1}^n (k_i) \times A^i}.$$

LEBENS LAUF

Am 12.6.1947 wurde ich in Ludwigsburg geboren.

Meine Mutter war Hauswirtschaftslehrerin, mein

Vater Wirtschaftsprüfer und Steuerberater. In

Ulm besuchte ich ab 1954 Grundschule und

Gymnasium und absolvierte 1966 das Abitur.

Danach studierte ich Biologie an der Ludwig -

Maximilian - Universität München, erhielt 1972

das Diplom und begann anschliessend die Doktor -

arbeit am genetischen Institut München.

